Untersuchungen zur Charakterisierung der Lymphocytenpopulationen von Schwein und Rind

Sigrid Pawlas

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0078

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. H. Buschmann

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER LYMPHOCYTENPOPULATIONEN VON SCHWEIN UND RIND

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Sigrid Pawlas
aus Altona

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

UNIV. LEIDEN BIBL.

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 27. Juli 1979

Druck: Dissertationsdruck Novotny jr., Starnberg

IN MEMORIAM

YUCAE ET XOTLIS

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung 1

2. Schrifttum 2
   2.1. Lymphocyten-Transformation und ihre mitogene Stimulierbarkeit
   2.2. Möglichkeiten und Problematik der Differenzierung von Lymphocyten 7
   2.3. Prinzipien und Möglichkeiten der Trennung von Lymphocytenpopulationen 18

3. Eigene Untersuchungen 21
   3.1. Material und Methoden 21
      3.1.1. Isolierung von Lymphocyten 21
      3.1.2. Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit von Lymphocyten durch die Messung des Einbaus von (U-^{14}C) Thymidin in DNS 24
      3.1.3. Differenzierung von Lymphocyten 28
         3.1.3.1. Bestimmung des Anteils E-Rosetten bildender Lymphocyten 28
         3.1.3.2. Bestimmung des Anteils EAC-Rosetten bildender Lymphocyten 29
         3.1.3.3. Nachweis von Ig-Rezeptoren an Lymphocyten mittels Protein A 31
      3.1.4. Trennung von Lymphocyten 32
         3.1.4.1. Gewinnung von B-Zellen mittels E-Rosettensedimentation 32
         3.1.4.2. Trennung von Lymphocyten mittels Affinitätschromatographie in Helix pomatia Lektin-Säulen 34

Seite

3.1.4.3. Trennung von Lymphocyten mittels Nylonfaser-Säulen 36

3.2. Ergebnisse 37

3.2.1. Untersuchungen zur mitogenen Stimulierbarkeit von Lymphocyten 37

3.2.2. Differenzierung von Lymphocyten 77

3.2.2.1. Bildung von E-Rosetten 77

3.2.2.2. Bildung von EAC-Rosetten 81

3.2.2.3. Anteil der fluoreszierenden Zellen nach der Behandlung der Lymphocyten mit FITC-Protein A 83

3.2.3. Trennung von Lymphocyten 84

3.2.3.1. Trennung von Lymphocyten mittels E-Rosettensedimentation 84

3.2.3.2. Trennung von Lymphocyten mittels Affinitätschromatographie in Helix pomatia Lektin-Säulen 92

3.2.3.3. Trennung von Lymphocyten mittels Nylonfaser-Säulen 99

4. Besprechung der Ergebnisse 108

5. Zusammenfassung 125
Summary

6. Literaturverzeichnis 127

1. Einleitung

Die Charakterisierung von Lymphocyten erfolgt hauptsächlich anhand des Nachweises von Oberflächenmarkern, charakteristischen Eigenschaften bestimmter Zellpopulationen, die in entsprechenden Rezeptoren an der Oberfläche der Zellen manifestiert sind. Die genaue Kenntnis dieser Rezeptoren - als Begriff erstmals von PAUL EHRLICH im Rahmen seiner Seitenkettentheorie (SCHATILOFF, P. 1908) in die Immunologie eingeführt - ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für einen genauen Einblick und einen gezielten Eingriff in immunologische Vorgänge, denn physiologische und pathologische Phänomene wie die Kooperation von Immunzellen untereinander, sowie mit bestimmten Serumfaktoren, Antigen-Antikörper-Reaktionen, Transplantatabstoßung und Autoaggressionen sind an das Vorhandensein und Zusammenspiel entsprechender Rezeptoren gebunden. Nur bekannte physiologische Verhältnisse innerhalb einer Spezies ermöglichen das Erkennen eventueller Abweichungen von der Norm.

Während Lymphocytenpopulationen und Subpopulationen von Mensch und "Labortieren" wie Ratte und Maus weitgehend anhand von Oberflächenmarkern identifiziert sind und die daraus resultierenden Erkenntnisse in der Humanmedizin bereits in Diagnostik und Therapie genutzt werden, liegen entsprechende Untersuchungen bei Haussäugetieren bisher noch lückenhaft vor.

Zu deren Ergänzung beizutragen soll Ziel der vorliegenden Arbeit sein.

2. Schrifttum

2.1. Lymphocyten-Transformation und ihre mitogene Stimulierbarkeit.

Die Transformation von Lymphocyten (Ausbildung von Blasten und mitotische Multiplikation), die in vivo durch Antigenkontakt induziert wird, kann auch in vitro durch die Inkubation von Kultur-Lymphocyten mit Antigenen oder Mitogenen (Substanzen, die durch transformierende Wirkung auf Lymphocyten charakterisiert sind) ausgelöst werden. Die mitogene Stimulierung in vitro setzt keine Antigenität voraus.

Grundsätzlich sind zwei Methoden zu unterscheiden:

- die unspezifische Transformation:
Nicht sensibilisierte Lymphocyten werden in vitro stimuliert

- die spezifische Transformation:
In vivo gegen ein bestimmtes Antigen (Ag) sensibilisierte Lymphocyten werden in vitro mit dem gleichen Ag stimuliert.

Die Möglichkeit der Transformation von Lymphocyten in vitro wurde zuerst zur Chromosomenanalyse genutzt und findet heute in vielen Bereichen der Forschung und Diagnostik Anwendung.

Wirkungsweise mitogener Substanzen:
Nach Anlagerung der Mitogenmoleküle (Liganden) an die zunächst mobil und gleichmäßig in Microaggregaten auf der Oberfläche der Lymphocyten verteilten Ig Moleküle (Rezeptoren), deren maximale Bindungskapazität nach MEHRISCHI (1974) temperaturabhängig in unterschiedlicher Zeit erreicht wird (10 - 15 min bei 37° C, 60 min bei 0° C), kommt es oberhalb 20° C innerhalb eines wiederum temperaturabhängigen Zeitraumes (TAYLOR et al. 1971) zur Konzentration der Liganden-Rezeptor-Komplexe an einem Zellpol (Kappenbildung oder "capping" genannt).

Für das Phytomitogen Concanavalin A konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei dem "capping" um einen selektiven Membrantransport handelt, da nur die Liganden-Rezeptor-Komplexe konzentriert werden, während gleichzeitig das "capping" anderer Rezeptoren gehemmt wird (OPPENHEIM u. ROSENSTREICH 1976, SINGER 1974). Dieser Vorgang ist allerdings abhängig von der Konzentration des Mitogens: zu hohe Konzentrationen hemmen die Beweglichkeit der Rezeptoren (TAYLOR et al. 1971).
Gleichzeitig mit der Kappenbildung kommt es zu einem Anstieg des Membranphospholipidumsatzes und zur Aktivitätserhöhung membranassoziierter Enzyme.
Die Folge dieser Membranprozesse, die ausschlaggebend sind für die Induktion einer Transformation (ANDERSSON et al. 1972), ist eine Erhöhung des intrazellulären Spiegels an cyclischem AMP, sowie eine Neuverteilung der lysosomalen sauren Hydrolasen.
Im Kern ist eine Zunahme der Proteinsynthese, die Aktivierung der RNS-Synthese, sowie die Aktivitätssteigerung mehrerer Enzyme (Uridinkinase, Ornithincarboxylase, RNS und DNS abhängige DNS-Polymerase) zu verzeichnen (LEVY u. ROSENBERG 1973). Eine Steigerung der DNS-Syntheserate tritt erst nach 24 Std. auf.

Als klassische MITOGENE stehen die PHYTOMITOGENE, globulinähnliche, aus Pflanzen extrahierbare Eiweißkörper, auch als "Lektine" bezeichnet, zur Verfügung.

Die mitogene Wirkung von PHYTOHÄMAGGLUTININ (PHA), einem Glykoprotein aus Phaeseolus vulgaris, wurde zuerst von HUNGERFORD et al. (1959) und NOWELL (1960) beschrieben.

PHA galt bisher als selektives T-Zell Mitogen. Nach PHILLIPS u. ROITT (1973) lassen sich jedoch auch B-Lymphocyten des Menschen in konventionellen Kulturen durch PHA stimulieren, während GREAVES u. BAUMINGER (1972) erst

durch die Bindung von PHA an Sepharose-Kügelchen eine Wirkung auf B-Zellen erzielten.
FOLCH u. WAKSMAN (1974) konnten nachweisen, daß die Höhe der Stimulierbarkeit von Rattenlymphocyten in umgekehrtem Verhältnis zur Höhe des Anteils von Suppressorzellen steht, einer T-Zell-Subpopulation, die mit dem Alter eines Individuums quantitativ stark reduziert wird.
Während die Lymphocyten junger Ratten zunächst nur schwach, die von alten Tieren dagegen wesentlich stärker durch PHA stimuliert werden konnten, zeigten auch Lymphocyten junger Ratten nach Eliminierung der Suppressorzellen aus der Gesamtpopulation eine deutlich gesteigerte Reaktion auf PHA.

POKEWEED-MITOGEN (PWM), aus Phytolacca americana, liegt in fünf Glykoproteinen verschiedener biologischer Aktivität vor (OPPENHEIM u. ROSENSTREICH 1976).
PWM stimuliert sowohl T- als auch B-Lymphocyten, wobei jedoch nur eines der fünf Lektine in der Lage ist, die zur Transformation nötigen Membranveränderungen an B-Zellen zu induzieren, obwohl alle eine Bindung mit den gleichen Rezeptoren der B-Zellen eingehen können (TAYLOR et al. 1971).
Dieses Phänomen zeigt, daß durch die Stimulierung von Lymphocyten nur ein positiver Beweis für das Vorhandensein von Rezeptoren für ein bestimmtes Mitogen zu führen ist. Nicht-Stimulierbarkeit dagegen ist kein Beweis für das Fehlen entsprechender Rezeptoren.

CONCANAVALIN A (Con A) ist ein globuläres Protein (enthält also im Gegensatz zu PHA und PWM keine Kohlenhydrate) aus Canavalia ensiformis.
Es galt zunächst wie PHA als selektives T-Zell Mitogen, doch auch hier ist inzwischen von Wirkungen auf B-Zellen berichtet worden. Während ANDERSSON et al. (1972) diese Wirkung durch lokale Konzentration von Con A an der O-

berfläche der Kulturschalen erreichten, beschreiben MACKLER et al. (1974) die Stimulierung von B-Zellen unter üblichen Kulturbedingungen. Eine Bindung von Con A an T- sowie B-Zellen konnte von GREAVES et al. (1972) und STOBO et al. (1972) nachgewiesen werden. Eine selektive Stimulierung dagegen ist nach Untersuchungen von ANDERSSON et al. (1972) sowie GREAVES u. BAUMINGER (1972) davon abhängig, in welcher Form Con A vorliegt: lösliches Con A stimuliert T-Zellen, unlösliches Con A stimuliert B-Zellen.

Außer den Pflanzenmitogenen zeichnen sich auch LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien (vor allem Enterobacteriaceae) als in vitro wirksame Mitogene aus. Für ihre mitotische Aktivität - selektiv auf B-Zellen wirksam - ist ihre Lipidfraktion A von entscheidender Bedeutung (ANDERSSON et al. 1973), für ihre thymusunabhängige Wirkung ihre bifunktionelle Natur als Mitogen und Antigen: bei Kontakt zwischen B-Zelle und LPS kommt es sowohl zur Membranbindung und -aktivierung als auch zur Aufnahme in die Zelle (PEAVY et al. 1973).
BONA et al. (1975) untersuchten die mitogene Wirkung von LPS S. minnesota sowie seiner isolierten Lipid A-Fraktion auf Lymphocyten aus menschlichem Blut, Affenblut und -milz, aus Lymphknoten von Meerschweinchen sowie aus der Milz von Kaninchen und Mäusen.
Eine deutliche Antwort wurde sowohl mit LPS als auch mit Lipid A nur bei der Stimulierung von Mäusemilzzellen erzielt. LPS S. minnesota konnte bei peripheren Lymphocyten und Milzzellen der anderen untersuchten Spezies nur eine schwache, Lipid A gar keine Reaktion auslösen.

Zur Erklärung dieser Ergebnisse wurden von BONA et al. (1975) drei Hypothesen diskutiert:

1) Der relativ hohe Gehalt an B-Zellen in der Mäusemilz (RAFF et al. 1970) - im Vergleich zu dem der peripheren Organe und auch der Milz der übrigen Spezies

(PREUD'HOMME u. SELIGMAN 1972, PERNIS et al. 1970, OPPENHEIM et al. 1969) - ist für die hohe Stimulierbarkeit verantwortlich.

2) Die starke Reaktion der Mäusemilzzellen ist als unspezifische, die schwache Reaktion der anderen untersuchten Lymphocyten als spezifisch antigene Stimulierung zu werten.

3) Als Ursache für die hohe Stimulierbarkeit ist die hämatopoetische Funktion der Milz adulter Mäuse anzusehen - einer Funktion, die der Milz der übrigen untersuchten Spezies nicht zukommt.

Auf Grund der Tatsache, daß aus Lymphknoten isolierte Lymphocyten auch bei der Maus nicht durch LPS stimulierbar sind, (mündliche Mitteilung von HUMPHREY, J.H. an BONA et al.), dagegen Knochenmarkszellen von Maus und Kaninchen eine deutliche Reaktion auf verschiedenste Antigene in vitro zeigen (MOND u. THORBECKE 1972), wurde der letzten Hypothese der Vorzug gegeben.

2.2. Möglichkeiten und Problematik der Differenzierung von Lymphocyten.

Die Differenzierung von B- und T-Lymphocyten erfolgt hauptsächlich anhand charakteristischer funktioneller Eigenschaften, die an bestimmte Oberflächenstrukturen gebunden sind und zu deren Untersuchung zahlreiche immunchemische und immunbiologische Methoden zur Verfügung stehen.

Für die morphologische Unterscheidung, die nur im Rasterelektronenmikroskop möglich ist (POLLIAK et al. 1973) sowie für die cytophoretische Untersuchung - Differenzierung auf Grund verschiedener elektrophoretischer Mobilität (ZEILLER u. PASCHER 1973) - sind nur in wenigen Laboratorien die technischen Voraussetzungen gegeben.

Einen Überblick über wesentliche, an Lymphocyten der Maus ausführlich erforschte Differenzierungsmerkmale gibt die folgende Tabelle:

Tabelle 2.2.1. Einige Eigenschaften von T- und B-Lymphocyten der Maus.

	T-Zellen Thymus	B-Zellen gastro-intestinales lymphoides Gewebe
Oberflächen-Marker		
Ig	sehr wenig	sehr viel
Thy	+	-
TL	+	-
Ly	+	-
PC	-	+
H_2	+	+
Fc-Rezeptor	-	+
C-Rezeptor	-	+
Häufigkeit (%)		
Blut	85	15
Lymphknoten	85	15
Milz	65	35
Knochenmark	selten	viele
Thymus	90	2 - 3
Funktionen		
Sekretion von AK	-	+
Helfereffekt	+	-
Effektorzelle in CMI	+	$\pm$
Stimulator in MLR	-	+
Reaktion in MLR	+	-
Inaktivierung durch		
Röntgenstrahlung	+	++++
Kortikosteroide	+	++
anti-Lymphocyten-Serum	++++	+

Fortsetzung von Tabelle 2.2.1.

	T-Zellen Thymus	B-Zellen gastrointestinales lymphoides Gewebe
Verteilung im Gewebe	interfollikuläre (T-abh.) Bereiche	Follikel um die Keimzentren
Reaktion auf Mitogene		
lösl. ConA	+	-
unlösl. ConA	+	+
PHA	+	+
PWM	+	+
PPD	-	+
LPS	-	+

(aus Sell 1977)

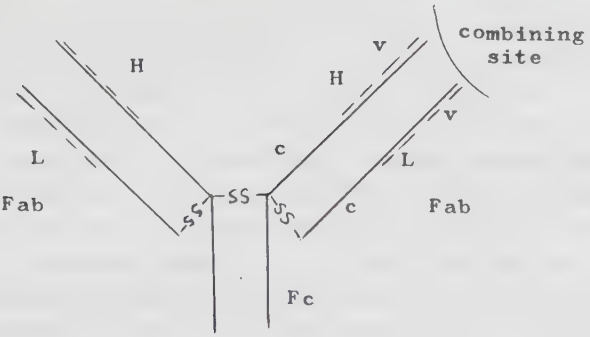
Von den zahlreichen in dieser Tabelle aufgeführten Charakteristika sollen jedoch nur diejenigen besprochen werden, die in der vorliegenden Arbeit an den Lymphocytenpopulationen von Schwein und Rind untersucht worden sind.

Der Nachweis membrangebundener IMMUNGLOBULINE (Ig-Rezeptoren) kann mittels radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierter Anti-Immunglobuline (anti-Ig) erfolgen, indem sich die Bindung des anti-Ig an Ig-Rezeptoren (Antikörper) durch Messung der Radioaktivität oder anhand der Membranfluoreszenz darstellen läßt.

Eine weitere gebräuchliche Methode stellt die Markierung von Ig-Rezeptoren mittels Protein A dar, das aus der Zellwand von Staphylococcus aureus isoliert wird, als einzelne Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 42 000 (BJÖRK et al. 1972) vorliegt und fähig ist, zwei Moleküle IgG pro Molekül zu binden (HJELM et al. 1975). Diese Bindung erfolgt jedoch, wie FORSGEN u. SJÖQUIST schon 1966 nachweisen konnten, nicht an der Ag-Bindungsstelle (combining site) der variablen Region des Fab-Fragments, sondern an der Fc-Region des Ig-Moleküls, sodaß die "combining sites" freibleiben und die Möglichkeit für die Bildung von Tertiärkomplexen aus Antigen-Antikörper(Ig)-Protein A gegeben ist.

Bei Verwendung des mit fluoreszierendem Isothiocyanat (FITC) markierten Protein A läßt sich auch diese spezifische Bindung an IgG auf der Oberfläche von Lymphocyten darstellen und damit das Vorhandensein von Ig-Rezeptoren nachweisen.

Vereinfachtes Schema einer Grundeinheit von Ig-Molekülen:



v = variable Region
c = konstante Region
ss = Disulfidbrücken
H = schwere Kette (heavy chain)
L = leichte Kette (light chain)

Während die Existenz membrangebundener Immunglobuline auf der Oberfläche von B-Lymphocyten eine unbestrittene Tatsache ist, haben Untersuchungen über entsprechende Rezeptoren an T-Zellen zu den widersprüchlichsten Ergebnissen geführt.

Obwohl bewiesen ist, daß auch T-Zellen Rezeptoren besitzen, die fähig sind, Antigen zu erkennen und mit ihm zu reagieren (MÖLLER, 1970; BASTEN et al. 1971), wurden diese bisher nicht eindeutig identifiziert.

Zwar konnten BANKHURST et al. (1971) leichte Ig-Ketten an T-Zellen, HAMMERLING u. RAJEWSKY (1971) IgM an T-Lymphocyten, die aus Lymphknoten, nicht jedoch an solchen, die aus dem Thymus isoliert waren, nachweisen, doch vertritt ROITT (1977) die Ansicht, daß Immunglobulin auf der Oberfläche

von T-Zellen kein Produkt dieser Zellen darstellt, sondern nur an Fc-Rezeptoren gebunden wird, die sich ausschließlich an der Oberfläche aktivierter T-Zellen befinden, während UNANUE et al. (1971) die Möglichkeit nicht ausschließen, daß es sich bei einer geringen Menge leichter Ig-Ketten, die sie an Thymocyten feststellten, lediglich um eine Serum-Kontamination handeln könnte.
MARCHALONIS et al. (1972), denen es gelang, aus Thymus-Lymphocyten von Mensch und Ratte IgM mit einem Molekulargewicht von ca. 200 000 mit leichten sowie mit schweren Ketten zu isolieren (dies entspricht der 7S- Untereinheit des IgM, das als Pentamer der 4-Ketten-Grundstruktur des Ig-Moleküls auftritt), weisen in diesem Zusammenhang auf den interessanten Aspekt hin, daß IgM in der phylogenetischen Entwicklung bereits vor Erscheinen der ersten Plasmazellen angetroffen wird.
Hinzuzufügen ist, daß die zelluläre Immunität, als deren Träger die T-Zellen gelten, gegenüber der humoralen nicht nur phylogenetisch, sondern auch ontogenetisch die ältere Form darstellt und daß auch dem Fetus zunächst nur IgM zur Verfügung steht (GITLIN, 1973, MIGGIANO et al. 1973, MURALT, 1972).

Im Gegensatz zu der Frage, ob Ig-Rezeptoren ausschließlich als B-Zell-Marker zu werten sind, scheinen bei der Differenzierung von Lymphocyten anhand von KOMPLEMENTREZEPTOREN eher quantitative Probleme im Vordergrund zu stehen.
Diese C'-Rezeptoren stellen Oberflächenstrukturen zur Bindung von Faktoren des Komplementsystems dar, dessen Name schon 1895 von Paul EHRLICH geprägt wurde und das nach neuesten Erkenntnissen aus mindestens 11 Serumproteinen, C'-Faktoren, besteht, die nach einem biologischen Verstärker-

prinzip von einer speziellen Ag-Ak-Reaktion, aber auch von unspezifischen Faktoren in bestimmter Reihenfolge aktiviert werden, zahlreiche verschiedene Funktionen erfüllen und in enger Beziehung zum Gerinnungssystem stehen.

Als Oberflächenmarker (BIANCO et al. 1970) finden besonders die C'_3-Rezeptoren Beachtung, da die C'_3 Komponente, durch Ag-Ak-Komplexe über C'_1, C'_4 und C'_2 aktiviert, eine Immunadhärenz induziert, die sich in vitro anhand von EAC-Rosetten darstellen läßt (HUBER et al. 1971; JONDAL et al. 1972). Diese mikroskopischen Strukturen entstehen durch Anlagerung von Schaferythrocyten (E), die mit hämolysierendem Ambozeptor (A) und Mäusekomplement (C) einen Ag-Ak-Komplement-Komplex bilden, an die Oberfläche C'_3-Rezeptoren tragender Lymphocyten. Allerdings ist nur eine Subpopulation von B-Zellen in der Lage, EAC-Rosetten zu bilden, da nach PARISH u. HAYWARD (1974) nicht alle B-Zellen C'_3 Rezeptoren besitzen, wogegen DUKOR et al. (1971) es für möglich halten, daß B-Zellen in bestimmten Differenzierungsstufen lediglich weniger C'_3 Rezeptoren tragen und deshalb nicht als rosettenbildende Zellen erfaßt werden können.

Nach ROITT (1977) sind nur etwa die Hälfte der B-Zellen, dagegen aber auch ein geringer Teil T-Zellen fähig, EAC-Rosetten zu bilden. Diese T-Zell-Rosetten lassen sich jedoch durch Inkubation mit Anti-Serum gegen leichte Ig-Ketten inhibieren, während die B-Zell-Rosetten erhalten bleiben.

Die Rosettenbildung anderer lymphatischer Zellen wie Makrophagen, Monocyten und neutrophiler Granulocyten ist an die Gegenwart von Mg^{++} Ionen gebunden und kann durch Zugabe von EDTA oder die Verwendung Mg^{++}-freier Puffer verhindert werden (LAY u. NUSSENZWEIG 1968, HUBER et al. 1971). Doch auch nach Ausschluß der Rosettenbildung durch andere Zellen kommt es zu mehr oder weniger stark differierenden Ergebnissen bei der Bestimmung der Anzahl von EAC-Rosetten

und damit des Anteils von B-Lymphocyten an einer Gesamtpopulation.

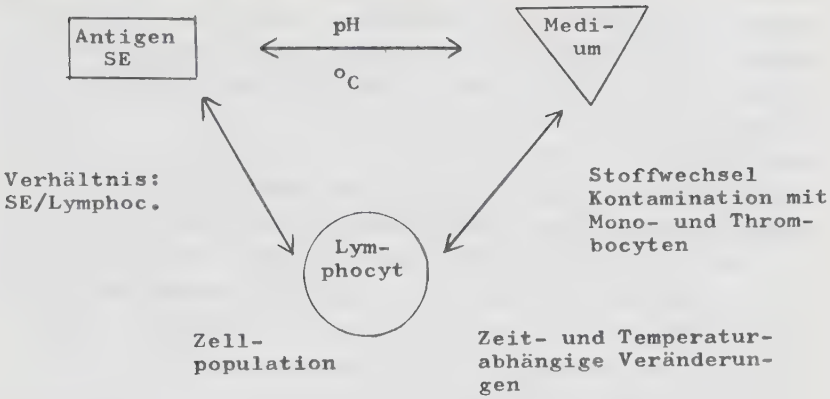
Während Angaben über den prozentualen Anteil der B-Zellen an der Lymphocytenpopulation des strömenden Blutes des Menschen zwischen 20 % (MICHELMAYR u. HUBER 1970) und 34 % (WILSON u. NOSSAL 1971) zu finden sind, reichen diese bei der Maus sogar von 10 % (RAFF 1971) bis 34 % (RAFF et al. 1971).

DE LIMA u. MITSCHERLICH (1973) konnten zwar altersbedingte Unterschiede im prozentualen Anteil von B-Zellen, der anhand der Bildung von EAC-Rosetten bestimmt wurde, im strömenden Blut von Rindern feststellen - einen Anstieg von 12,6 % im ersten auf 18,6 % im vierten Lebensjahr, dann wieder einen Abfall auf 12,9 % bei über 10 Jahre alten Tieren -, beschreiben jedoch auch einen signifikanten Einfluß verschiedener Versuchsbedingungen auf die Anzahl der EAC-Rosetten:

- Alter der Blutprobe und Inkubationszeit des Reaktionsgemisches.
- Hundertsatz der lebenden Zellen in der zum Test hergestellten Lymphocytensuspension.
- Gesamtzahl der aus jedem Reaktionsgemisch ausgezählten Lymphocyten.

Entsprechende Schwierigkeiten ergeben sich auch bei der quantitativen Bestimmung von T-Zellen auf Grund ihrer Fähigkeit, mit nicht sensibilisierten Schaferythrocyten Spontanrosetten oder E-ROSETTEN zu bilden (SEILER et al. 1972).

Zahlreiche Parameter, welche die Testergebnisse beeinflussen können, sind von MERCIER (1974) zusammengestellt worden:



SE = Schaferythrocyten

(nach MERCIER, entnommen aus BUNDSCHUH u. SCHNEEWEISS 1976)

Weitere Möglichkeiten zur Erklärung so stark differierender Werte für den Anteil E-Rosetten bildender Zellen aus Lymphocyten des menschlichen Blutes wie z. B. von 37 % (BROWN et al. 1975) und 77 % (ANTHONY et al. 1975), für Lymphocyten aus dem strömenden Schweineblut 89 % (KAUPP et al. 1977) und 30 % (ESCAJADILLO u. BINNS 1975) sehen KAUPP et al. (1977) u. a. in der Tatsache, daß verschiedene Autoren "Rosetten" mit einer ungleichen Anzahl von Schaferythrocyten, die an einen Lymphocyten gebunden werden, definieren.

Diese Definitionen reichen von 1 oder mehr (BENTWICH et al. 1973) über 2 oder mehr (BROWN u. GREAVES 1974) sowie 3 oder mehr (ANTHONY et al. 1975, KAPLAN u. CLARK 1974, EVANS et al. 1975, YU u. PEARSON 1975) bis zu 5 oder mehr Schaferythrocyten pro Lymphocyt (ESCAJADILLO u. BINNS 1975).

Darüberhinaus weisen FRUCHTMANN et al. (1977) daraufhin, daß die Fähigkeit, E-Rosetten zu bilden, an ein bestimmtes Reife-

stadium der T-Zellen gebunden ist, während FINK (1977) feststellen konnte, daß Lymphocyten des gleichen Individuums einen unterschiedlichen Anteil von E-Rosetten aufwiesen, wenn Schaferythrocyten verschiedener Spendertiere verwendet wurden.
Eine Erhöhung des Anteils von E-Rosetten ist durch die Behandlung der Erythrocyten mit Neuraminidase beschrieben worden, eine Methode, die zuerst von BAXLEY et al. (1974) für die E-Rosettenbildung unter Benutzung neuraminidasebehandelter menschlicher Erythrocyten angewandt wurde. Bei der Bildung von E-Rosetten aus Rinderlymphocyten und Schaferythrocyten erreichten GREWAL et al. (1976) durch die Behandlung der Erythrocyten eine Steigerung auf durchschnittlich 24 % gegenüber 4 - 6 % Rosetten mit unbehandelten Erythrocyten und einen weiteren Anstieg auf durchschnittlich 32 % nach der Behandlung von Erythrocyten und Lymphocyten mit Neuraminidase, während FRUCHTMANN et al. (1977) bereits ohne Behandlung einen Durchschnitt von 20 % erzielten, der nach Behandlung der Erythrocyten auf 38 % erhöht werden konnte, jedoch nach Behandlung von Erythrocyten und Lymphocyten geringfügig auf 32 % absank.

Als Konsequenz der stark variierenden Angaben über den Anteil E- sowie EAC-Rosetten bildender Zellen ergibt sich aus den meisten Ergebnissen ein ebenso unterschiedlicher Anteil von Zellen, die über die Rosettenbildung nicht erfaßt und als "Null-Zellen" bezeichnet werden, während dagegen KAUPP et al. (1977) bei ihren Untersuchungen von Schweinelymphocyten aus dem strömenden Blut neben 89 % E-Rosetten 30 % EAC-Rosetten bildende Zellen erfaßten, sodaß also bei einer Summe von 119 % mindestens 19 % der Zellen sowohl Rezeptoren für normale Schaferythrocyten besitzen müssen, als auch für solche, die mit Antikörper und Komplement beladen sind, womit dieses Phänomen, sowie das der "Null-Zellen" die Frage nach dem qualitativen Aussagewert der Rosettenbildung bei

der Differenzierung von B- und T-Zellen aufwirft.

Auf Grund dieser zahlreichen Probleme, die sicher gelöst, aber auch durch neue Fragestellungen und Erkenntnisse immer wieder ergänzt werden können, scheint es nötig, durch Untersuchung möglichst zahlreicher - wenn auch im einzelnen z. T. noch umstrittener - Charakteristika zu einem Gesamtergebnis zu gelangen, das der Differenzierung von Lymphocytenpopulationen in qualitativer und quantitativer Hinsicht weitgehend gerecht wird.

2.3. Prinzipien und Möglichkeiten der Trennung von Lymphocytenpopulationen.

Ebenso wie die Differenzierung basiert auch die Trennung von Lymphocyten auf unterschiedlichen Oberflächenstrukturen der einzelnen Zellpopulationen, aus denen ungleiche funktionelle immunologische und physikalische Eigenschaften resultieren.

Mehrere Möglichkeiten, diese Unterschiede zu nutzen, bietet die AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE, die auf der selektiven und reversiblen Bindung zweier Reaktionspartner beruht, von denen einer der Partner an ein unlösliches Gel oder Polymer fixiert wird.

In ANTI-IG-SÄULEN wird ein speziesspezifisches Anti-Ig bzw. Anti-Fab z. B. an Sepharose (SCHLOSSMAN u. HUDSON 1973) oder Glasperlen fixiert (WIGZELL et al. 1972).
Bei der Passage von Lymphocyten durch diese Säulen werden Ig-tragende Zellen als zweiter Reaktionspartner über die Bildung von Ag-Ak-Komplexen an das fixierte Ag gekoppelt, während Zellen ohne Ig-Rezeptoren nach freiem Durchfluß im Eluat erscheinen. Die Ablösung der gebundenen Zellen kann durch enzymatische Spaltung der Ag-Ak-Komplexe oder durch Zugabe eines kompetitiven Haptens durchgeführt werden.

Ebenfalls nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie wurde zuerst von HAMMARSTRÖM 1973 die Trennung von Lymphocyten in HELIX POMATIA LEKTIN-SÄULEN beschrieben.
Dieses Lektin aus der Weinbergschnecke Helix pomatia besitzt im Gegensatz zu den in 2.1. beschriebenen pflanzlichen Lektinen keine mitogenen Eigenschaften (HAMMARSTRÖM et al., (1975), sondern zeichnet sich neben seinen Fähigkeiten, menschliche Erythrocyten der Blutgruppe A zu agglutinieren und kohlenhydrathaltige Moleküle mit endstän-

digen N-acetyl-α D-Galaktosamin Resten zu binden, durch die spezifische Bindung mit Neuraminidase behandelter T-Lymphocyten aus (HAMMARSTRÖM et al. 1973), sodaß diese beim Durchfluß durch Säulen, in denen Helix pomatia Lektin an Sepharose fixiert ist, gebunden werden, während Zellen ohne Helix pomatia-Rezeptoren, B-Lymphocyten, eluiert werden können.
Ein kleiner Anteil leicht gebundener, unreifer B-Zellen (HELLSTRÖM et al. 1978) läßt sich durch Auswaschen mit geringen, die Fraktion stark gebundender T-Zellen mit höheren Konzentrationen des kompetitiven Haptens N-acetyl-α - D-Galactosamin ablösen.
Diese Fraktionierung, die Helix pomatia-Rezeptoren als Oberflächenmarker für T-Zellen ausweist, konnte anhand von E- und EAC-Rosettenbildung, sowie des Nachweises von Ig-Rezeptoren für Lymphocyten aus dem strömenden Blut von Mensch (HAMMARSTRÖM et al. 1973, UHLENBRUCK et al. 1973) und Maus (HALLER et al. 1977) sowie aus dem strömenden Blut und der Milz von Ratten (SWANBORG et al. 1977) belegt werden.

Entsprechende Möglichkeiten zur Fraktionierung von Lymphocyten konnten auch durch die Bindung von B-Zellen an pflanzliche Lektine aus Sojabohnen (REISNER et al. 1976) und aus Ulex europeus (GÜRTLER u. CLEVE 1978) nachgewiesen werden.

Die Trennung von Lymphocyten in NYLONFASER-SÄULEN (JULIUS et al. 1973) wird durch die physikalische Eigenschaft der Adhäsivität von B-Zellen ermöglicht, die bei Durchfluß von Lymphocyten an den Nylonfasern haften, während die nicht adhäsiven T-Zellen die Säule frei passieren.

Die erfolgreiche Anwendung dieser Technik bei der Trennung von Rinderlymphocyten wurde von GREWAL et al. (1976) und ROUSE u. BABIUK (1974) beschrieben.

Eine weitere gebräuchliche Methode, die von FRUCHTMANN et al. (1977) auch zur Gewinnung von T-Zellen des Rindes angewandt wurde, stellt die E-ROSETTEN-SEDIMENTATION dar, bei der nach Inkubation der Lymphocyten mit Schaferythrocyten nicht E-Rosetten bildende - und damit nicht durch Aggregatbildung sedimentierte - Zellen über Ficoll-Isopaque von den durch E-Rosettenbildung sedimentierten Zellen getrennt werden können.
Die Reinheit der Fraktion nicht sedimentierter Zellen als nicht E-Rosetten bildende B-Zellpopulation muß jedoch angesichts der Tatsache, daß mit der E-Rosettenbildung nicht die gesamte T-Zellpopulation erfaßt wird, in Frage gestellt und diese Fraktion besser als mit B-Zellen angereichert betrachtet werden.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Isolierung von Lymphocyten

Die Entnahme von Blut und Milz erfolgte grundsätzlich so steril wie möglich direkt nach der Tötung von Schlachttieren.
Alle Geräte und chemischen Substanzen wurden nur in sterilem Zustand verwendet.

Aufbereitung der Milz:
Ein ca. 125 cm^3 großes Stück Milz wurde mit einer Schere von äußerlichen Fett- und Bindegewebsresten befreit, mit einem Skalpell die Kapsel zur Hälfte entfernt und dann die Pulpa mit einem Löffel ausgeschabt, wobei - im Gegensatz zur Methode der Zerkleinerung des gesamten Milzabschnitts - bereits das Bindegewebsgerüst fast vollständig zurückgelassen werden konnte.
Unter Zugabe von PBS mit Bykomycin[1)] (10 mg Neomycinsulfat / 100 ml PBS) wurde die Pulpa durch ein feinmaschiges Metallsieb gepreßt, die gewonnene Suspension durch eine 6fache Gazelage filtriert und mit PBS (mit gleichem Antibiotikazusatz wie oben) auf die benötigte Menge aufgefüllt.

Gewinnung der Lymphocyten:
Je 20 ml heparinisiertes Blut (500 IE Heparin / 100 ml Blut), zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt, bzw. 40 ml der oben beschriebenen Milzzellsuspension wurden vorsichtig mit einer Pipette in Glaszentrifugengläser auf die gleiche Menge folgenden Gemisches geschichtet:

---

1) Byk Gulden, Konstanz

- 24 Teile Ficoll [2] (9 g / 100 ml aqua bidest.)
- 10 Teile Isopaque (1 ml Sodium Metrizoate Solution [3] 75 % (w/v) / 2,2 ml aqua bidest.)

Das Ganze wurde folgendermaßen zentrifugiert:
- Schweineblut 30 min bei 400 g'
- Rinderblut, sowie
- Milzzellsuspension von Rind und Schwein 40 min bei 500 g'.

Auf Grund verschiedener Dichte der flüssigen Phasen, sowie unterschiedlicher Größe der Zellen - unterstützt durch ungleiche Neigung zur Aggregatbildung - ergibt sich nach dem Zentrifugieren folgende Schichtung:
- ein Bodensatz aus Erythrocyten und Granulocyten
- darüber das Ficoll-Isopaque Gemisch (mit einem geringen Anteil nicht sedimentierter Erythrocyten und Granulocyten)
- auf dessen Oberfläche eine schmale Schicht von Lymphocyten (mit einem Anteil von ca. 10 % Makrophagen)
- als oberste Schicht ein Plasma-PBS-Gemisch mit Thrombocyten.

Nach Entfernung der obersten Schicht wurden die Lymphocyten vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, wobei allerdings bei größter Sorgfalt kaum zu vermeiden ist, daß ein geringer Teil des darunterliegenden Gemisches - und damit ein Teil der nicht sedimentierten Zellen - mit aufgenommen wird.

Die so gewonnenen Zellen wurden 1:2 mit RPMI 1640 [4] (mit L-Glutamin, ohne $NaHCO_3$) verdünnt und gewaschen.

---

2) Pharmacia, Uppsala, Schweden
3) Nyegaard u. Co., AS, Oslo
4) Seromed, München

- RPMI 1640 wurde grundsätzlich mit folgenden Zusätzen (künftig als Standardzusätze bezeichnet) verwendet:
- Bykomycin [1] (100 mg Neomycinsulfat / 1 Medium)
- Kanamycin [5] (0,2 mg Kanamycinsulfat / 1 Medium)
- Hepes [6] N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthan-sulfonsäure, Puffersubstanz nach Good (2,5 mMol / 1 Medium).

Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 500 g' abzentrifugiert, in 5 - 10 ml Medium resuspendiert, gezählt und der Anteil der lebenden Zellen überprüft.

Bestimmung der Zellzahl:
Je 0,05 ml Zellsuspension wurden mit 2,5 und 5,0 ml Kristallviolettlösung (10,5 g Zitronensäure + 0,5 g Kristallviolett / 500 ml aqua bidest.) 1:50 bzw. 1:100 verdünnt und die mononukleären Zellen in einer Thoma Zählkammer ausgezählt.

Bestimmung der Lebensfähigkeit der Zellen:
0,1 ml Zellsuspension wurden mit der gleichen Menge Trypanblaulösung (Trypanblau 1 %ig in PBS) gemischt und der Anteil der gefärbten, d. h. toten von insgesamt 100 ausgezählten Zellen bestimmt.
Nur Zellen mit einer Lebensfähigkeit von mehr als 95 % wurden weiterverwendet.

(Methode nach BOYUM, 1968).

---

1) Byk Gulden, Konstanz
5) Grünenthal GmbH, Stolberg
6) Serva Feinbiochemica, Heidelberg

3.1.2. Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit von Lymphocyten durch die Messung des Einbaus von (U-^{14}C) Thymidin in DNS.

Lymphocyten wurden auf eine Konzentration von 7 x 10^5 Zellen pro ml folgenden Kulturmediums eingestellt:
RPMI 1640 + Standardzusätze
+ 10 % inaktiviertes FKS
+ 1 % TC-Glutamine 5 % Difco [7] (400 mMol / 100 ml Medium).
Je 1 ml dieser Zellsuspension wurden in Zellkulturröhrchen [8] pipettiert und jeweils 1 ml folgender Lösungen hinzugefügt:
- RPMI 1640 + Standardzusätze zu den Zellkontrollen
- Mitogenverdünnungen in RRMI 1640 + Standardzusätze zu den Proben.

Von allen Mitogenverdünnungen sowie den Zellkontrollen wurden jeweils 5 gleiche Parallelproben angesetzt.
Dann wurden die Röhrchen 48 Stunden bei 37° C im Brutschrank mit einem Gasgemisch aus 10 % O_2, 4 % CO_2 und 86 % NO_2 inkubiert, danach mit je 0,1 µCi (U-^{14}C) Thymidin [9] (spez. Aktivität 500 - 600 mCi / mMol) markiert und weitere 24 Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Anschließend wurde der Inhalt der Röhrchen durch Millipore-Filter AP 2002500 [10] über ein Filter-Pumpen-System [11] filtriert, jedes Röhrchen mit
2 x 2 ml PBS (ohne Mg^{++} und Ca^{++})
2 x 2 ml 7 %iger Trichloressigsäure
2 x 2 ml Methanol

---

7) Difco Laboratories, Detroit, USA
8) Nunclon, Dänemark
9) Radiochemical Centre Ltd., Amersham, England
10) Millipore S.A., Molsheim, Frankreich
11) Millipore Corporation, Bedford, USA

ausgespült und die Spülflüssigkeit wiederum über die gleiche Anlage filtriert.

Durch diesen Prozeß werden alle Zellen aus den Röhrchen abgelöst, ihre DNS gefällt auf den Filtern zurückbehalten und überschüssiges, d. h. nicht eingebautes (U-^{14}C) Thymidin ausgewaschen. Die Filter wurden dann in Zählfläschchen [12] überführt, 30 min bei 80° C getrocknet, nach dem Abkühlen mit je 10 ml Szintillationsflüssigkeit (29 g Fluoralloy [13] / 3 785 ml Toluol) aufgefüllt, weitere 30 min im Flüssigkeitsszintillationszähler [14] vorgekühlt und dann die counts per minute gemessen.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach folgenden Formeln:

Mittelwert der counts per minute: cpm $\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n}$

Standardabweichung: $s = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$

Standarderror: $se = \frac{s}{\sqrt{n}}$

Stimulationsindex: $si = \frac{\bar{x} \text{ Proben (mit Mitogen)}}{\bar{x} \text{ Kontrollen (ohne Mitogen)}}$

n = Anzahl der jeweils gleichen Probanden = 5

---

12) Zinsser, Frankfurt
13) Beckman Instruments Inc., USA
14) Isocap. Nuclear, Chicago, USA

Substanzen, die auf mitogene Wirkung untersucht wurden:

1) Gereinigtes Phytohämagglutinin [15] (PHA) aus Phaeseolus vulgaris in den Konzentrationen:
50 / 25 / 10 / 5 / 1 / 0,5 / 0,05 µg/ml

2) Concanavalin A [16] (Con A) in den Konzentrationen:
100 / 50 / 25 / 10 / 5 / 1 / 0,5 / 0,05 µg/ml

3) Pokeweed Mitogen [17] (PWM) aus Phytolacca americana in den Konzentrationen:
100 / 50 / 25 / 10 / 5 / 1 / 0,5 / 0,05 µg/ml

4) Lipopolysaccharide W (Methode Westphal) Salmonella typhosa [18] (LPS) in den Konzentrationen:
3 200 / 1 600 / 800 / 400 / 200 / 20 / 5 / 1 / 0,5 / 0,05 µg /ml

---

15) Wellcome Research Laboratories, Beckenham, England
16) Pharmacia, Uppsala, Schweden
17) Serva, Heidelberg
18) Difco Laboratories, Detroit, USA

Versuchsvarianten

Änderung der Zellzahl.
Neben der üblicherweise benutzten Zellzahl von 7 x 10^5/ml Zellsuspension wurden Parallelversuche mit der Einsaat von 3,5 x 10^5 sowie 14 x 10^5 Lymphocyten / ml Zellsuspension durchgeführt.

Behandlung der Lymphocyten mit Neuraminidase.
Vor der Einsaat in Zellkulturröhrchen erfolgte eine einstündige Inkubation der Lymphocyten bei 37° C mit
- 0,2 ml Neuraminidase [19] (aus Vibrio cholerae, pH 5,0), 1:6 in PBS verdünnt, pro
1,0 ml Zellsuspension (5 x 10^6 Zellen / ml Medium).

Vorbehandlung von Rinder- bzw. Schweineblut mit Carbonyleisenpulver.
Das Blut wurde 30 min bei 37° C auf einem Magnetrührer mit 15 mg Carbonyleisenpulver pro ml inkubiert, dann der Magnetstab mit dem daran haftenden Eisenpulver mit dem Anteil von Makrophagen, die Eisen phagocytiert hatten, entfernt und die übliche Isolierung der Lymphocyten vorgenommen.

---

19) Serva, Heidelberg

3.1.3. Differenzierung von Lymphocyten

3.1.3.1. Bestimmung des Anteils E-Rosetten bildender Lymphocyten.

In inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) - zuerst 2 Stunden bei Zimmertemperatur, dann über Nacht bei 4° C mit 1/10 Volumen gepackter, gewaschener Schaferythrocyten adsorbiert - wurden 2 x 10^6 Lymphocyten / ml suspendiert und zu gleichen Teilen mit einer 1 %igen Suspension von Schaferythrocyten in RPMI 1640 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert, 5 min bei 200 g' abzentrifugiert und über Nacht bei 4° C nochmals inkubiert.
Unter leichtem Aufschütteln der Zellen wurden dann zu je 0,2 ml dieser Zellsuspension 1 Tropfen Toloidinblaulösung (Toloidinblau 0,5 %ig in PBS) gegeben und nach 15 min die Prozentzahl der E-Rosetten bildenden von insgesamt 300 ausgezählten Lymphocyten in der Thomazählkammer bestimmt. Nur Lymphocyten mit mindestens 3 an der Oberfläche angelagerten Erythrocyten wurden als E-Rosetten gewertet.

Versuchsvariante

Vorbehandlung der Erythrocyten und / oder der zu untersuchenden Lymphocyten mit Neuraminidase (Methode nach BAXLEY et al. 1973).
1 Teil gepackte Schaferythrocyten + 5 Teile Neuraminidase (1 : 6 in PBS verdünnt) wurden 60 min bei 37° C,
5 x 10^6 Lymphocyten / ml RPMI 1640 + 0,1 ml Neuraminidase (gleiche Konzentration wie oben) 30 min bei 37° C inkubiert, 3 x in PBS gewaschen und dann wie in 3.1.2. weiterbehandelt.

3.1.3.2. Bestimmung des Anteils EAC-Rosetten bildender Lymphocyten

Schaferythrocyten, 3 x in PBS gewaschen, wurden 5 %ig in PBS suspendiert und zu gleichen Teilen mit einer Verdünnung von Kaninchenantiserum gegen gekochtes Erythrocytenstroma (1: 1 000 in PBS) gemischt, 30 min unter Schütteln bei 37° C inkubiert, 2 x in PBS gewaschen und 5 %ig in Hanks-Balanced-Salt-Solution [20] (pH 7,2) resuspendiert.
Diese Suspension wurde 30 min bei 37° C mit der gleichen Menge Mäusekomplement inkubiert, das zuvor erst 2 Stunden bei Zimmertemperatur, dann über Nacht bei 4° C mit gepackten, gewaschenen Schaferythrocyten inkubiert und anschließend 1 : 10 in PBS verdünnt worden war.
Nachfolgend wurden die Erythrocyten 3 x in PBS gewaschen, 0,5 %ig in Hanks-Balanced-Salt-Solution suspendiert und 0,1 ml dieses EAC-Rosetten-Indikators mit 0,1 ml Lymphocytensuspension (2 x 10^6 Zellen / ml RPMI 1640) gemischt,
30 min bei 37° C inkubiert und 5 min bei 200 g' zentrifugiert.
Nach vorsichtigem Resuspendieren der Zellen wurde 1 Tropfen Toloidinblaulösung hinzugefügt und nach 15 min der Anteil der EAC-Rosetten bildenden Lymphocyten an insgesamt 300 ausgezählten Lymphocyten in der Thoma-Zählkammer bestimmt.

Um die Rosettenbildung von Monocyten und evtl. vorhandenen Granulocyten auszuschließen, wurde während des gesamten Versuches nur PBS ohne Mg^{++} und Ca^{++} verwendet (LAY u. NUSSENZWEIG 1968, JONDAL, HOLM u. WIGZELL 1972).

---

20) Oxoid Ltd. Basingstoke, Hants, England

Als positiv EAC-Rosetten bildende Zellen wurden nur Lymphocyten gewertet, die mindestens 5 Erythrocyten ein- oder mehrschichtig an ihrer Oberfläche angelagert hatten.

Versuchsvariante

5×10^6 Lymphocyten in 1 ml Medium wurden mit 0,1 ml Neuraminidase (1:6 in PBS verdünnt) 30 min bei 37° C inkubiert und dann wie üblich weiterbehandelt.

3.1.3.3. Nachweis von Ig-Rezeptoren an Lymphocyten mittels Protein A

Jeweils 10^6 Lymphocyten, 3 x in PBS gewaschen, wurden mit 0,05 ml FITC-Protein A [21] (Staph. aureus) (1 mg / 1 ml PBS) 30 min bei 4° C inkubiert, 3 x in PBS gewaschen, abzentrifugiert und in 3 Tropfen Glycerin (zu gleichen Volumenteilen mit PBS verdünnt) resuspendiert.
Ein Tropfen dieser Zellsuspension wurde auf einen Objektträger gebracht und der prozentuale Anteil der fluoreszierenden Zellen an insgesamt 300 ausgezählten Lymphocyten im Fluoreszenzmikroskop [22] ermittelt.
(Hg-Lampe HBO 200 W, Filter KP 500, Sperrfilter K 510).

---

21) Pharmacia, Uppsala, Schweden
22) Leitz, Wetzlar

3.1.4. Trennung von Lymphocyten

3.1.4.1. Gewinnung von B-Zellen mittels E-Rosettensedimentation

Lymphocyten, über Ficoll-Isopaque isoliert, wurden im Verhältnis 1:50 mit Schaferythrocyten gemischt, die wie folgt vorbehandelt waren:
Schafblut, 1:10 in PBS verdünnt, wurde 10 min bei 400 g' zentrifugiert, das Sediment 2x in PBS gewaschen und in gleicher Weise abzentrifugiert. Dann wurden die gepackten Erythrocyten (ca. 2x 10^9/ml) 1:10 in PBS resuspendiert und mit 0,008 IU Neuraminidase [23] 1 Stunde bei 37° C inkubiert, 3x in PBS gewaschen und in RPMI 1640 in einer Konzentration von 1 x 10^9 Zellen / ml resuspendiert und 15 min bei 37° C inkubiert.
Dieses Lymphocyten-Erythrocyten-Gemisch wurde 15 min bei 200 g' zentrifugiert und dann 60 min im Eisbad inkubiert, anschließend vorsichtig resuspendiert, auf 4° C kaltes Ficoll-Isopaque geschichtet und 30 min bei 400 g' und 4° C zentrifugiert. Die entstandene Zwischenschicht nicht Rosetten bildender (nicht sedimentierter) Zellen wurde vorsichtig mit der Hälfte des darunterliegenden Ficoll-Isopaque-Gemisches abgesaugt, 1:3 in RPMI 1640 verdünnt, 10 min bei 400 g' abzentrifugiert und noch zweimal mit RPMI 1640 gewaschen.
Zum Nachweis der erfolgten Fraktionierung der Lymphocyten kamen folgende Methoden zur Anwendung:

1) Bildung von E- und EAC-Rosetten
2) Nachweis von Ig-Rezeptoren mittels Protein A
3) ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit.

---

23) Behringwerke AG, Marburg

Jede dieser Nachweismethoden wurde mit der Gesamt-Lymphocytenpopulation und mit den nach der E-Rosettensedimentation nicht sedimentierten Zellen durchgeführt.

3.1.4.2. Trennung von Lymphocyten mittels Affinitätschromatographie in Helix-pomatia Lektin-Säulen.

3 ml Helix pomatia Lektin-Sepharose 6 MB [24] wurden in kleine Säulen (K9/15 mit 80 µm Netz) [25] gefüllt und mit 30 ml Startpuffer (PBS + 0,2 % HSA + 0,02 % NaN_3) bei einer Flußrate von maximal 1 cm/min äquilibriert.
8 - 10 x 10^7 Lymphocyten, vorher 45 min bei 37° C mit Neuraminidase inkubiert - 10 ml Lymphocytensuspension mit 12,5 x 10^6 Zellen / ml Tris-gepufferter Hankslösung (pH 7,4) + 5 µg/ml Neuraminidase clostridium perfringens [26] - und 2 x mit PBS-HSA-NaN_3 gewaschen, wurden anschließend in 1 - 1,5 ml der gleichen Lösung auf die Säule gegeben, nach Eindringen der Zellen der Fluß gestoppt und die Säule 15 min bei Zimmertemperatur inkubiert.

Zur Gewinnung der ungebundenen Zellen (F_1) folgte ein Auswaschen der Säule mit 80 ml PBS-HSA-NaN_3 bei einer Flußrate von 6 - 10 ml/min, zum Loslösen der gebundenen Zellen (F_2) ein Durchlauf von 80 ml PBS-HSA-NaN_3 mit 0,1 mg/ml N-Acetyl-α-D-Galaktosamin [27], sowie ein erneutes Auswaschen mit 80 ml PBS-HSA-NaN_3, diesmal mit 1,0 µg/ml N-Acetyl-α-D-Galactosamin zur Lösung stark gebundener Zellen.
(Technik nach HAMMARSTRÖM et al. 1973).

Zum Nachweis der erfolgten Fraktionierung der Lymphocyten kamen auch hier folgende Nachweismethoden zur Anwendung:

---

24) Pharmacia, Uppsala, Schweden
25) Pharmacia, Uppsala, Schweden
26) Sigma, St. Louis, USA
27) Sigma, St. Louis, USA

1) Bildung von E- und EAC-Rosetten
2) Nachweis von Ig-Rezeptoren mittels Protein A
3) ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit.

Jede dieser Nachweismethoden wurde mit der Gesamt-Lymphocytenpopulation und - soweit die jeweilige Ausbeute an Zellen es ermöglichte - mit den Zellen der einzelnen Eluate durchgeführt.

3.1.4.3. Trennung von Lymphocyten mittels Nylonfaser-Säulen.

Je 1 g Nylonwatte aus Leukopak-Filtern [28], zuvor eine Woche bei 37° C in aqua dest. gewaschen und danach bei ebenfalls 37° C getrocknet, wurde locker in 20 ml Plastikspritzen gepackt, mit Folie verschlossen autoklaviert, mit 20 ml PBS (mit 5 % inaktiviertem FKS) gewaschen, wieder mit Folie verschlossen und 1 Std. bei 37° C inkubiert.
Nach Einbringen von 1 - 1,5 x 10^8 Zellen in 2 ml 37° C warmes Medium (PBS + 5 % inakt. FKS) folgte nochmals ein Auswaschen mit 2 ml dieses Mediums, eine Inkubation von 45 min bei 37° C und wiederum ein Auswaschen mit 37° C warmem Medium, wovon die ersten 25 ml des Eluats in Zentrifugenröhrchen gesammelt, 10 min bei 290 g' und 4° C zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in RPMI resuspendiert wurden.

Zur Loslösung der adhäsiven, nicht im ersten Eluat enthaltenen Zellen, erfolgte dann ein Auswaschen der Säule mit einer 37° C warmen Lösung (pH 7,4) von:

Na_2EDTA	0,2 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	0,2 g
Glucose	0,2 g

ad 1 000 ml aqua dest.

(Technik etwas modifiziert nach JULIUS et al., 1973).

Zum Nachweis der erfolgten Fraktionierung der Lymphocyten kamen wiederum folgende Nachweismethoden zur Anwendung:

1) Bildung von E- und EAC-Rosetten
2) Nachweis von Ig-Rezeptoren mittels Protein A
3) ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit.

---

28) Fenwal Laboratories, Deerfield, Illinois, USA

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Untersuchungen zur mitogenen Stimulierbarkeit von Schweine- und Rinderlymphocyten, sowie zur Ermittlung der dafür günstigsten Mitogen-Konzentrationen, nachgewiesen anhand des Einbaus von ^{14}C-Thymidin.

Die angegebenen Wert wurden jeweils aus 5 Parallelproben ermittelt und für cpm $\bar{x}$ sowie se auf ganze Zahlen gerundet.

cpm $\bar{x}$ = Mittelwert der counts per minute
se = Standarderror
si = Stimulationsindex.

Tabelle 1: Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus dem strömenden Schweineblut durch Phytohämagglutinin (PHA)

Versuchs-datum	PHA-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
1. 2. 77	- Zellkontrollen	710 ± 79	———
	25	14 778 ± 1 966	20,81
	5	11 826 ± 287	16,65
	0,5	1 106 ± 39	1,56
	0,05	801 ± 72	1,13
17. 5. 77	- Zellkontrollen	140 ± 23	———
	50	49 294 ± 7 794	351,00
	25	42 666 ± 2 176	308,81
	10	62 171 ± 8 883	442,00
	1	17 331 ± 4 595	123,41
23. 5. 77	- Zellkontrollen	222 22	———
	50	29 640 ± 1 011	133,78
	25	28 371 ± 1 515	128,05
	10	46 631 ± 4 538	210,47
	5	40 734 ± 3 950	183,85
	1	10 378 ± 3 298	46,84
	0,5	1 390 ± 107	6,28
17.10. 77	- Zellkontrollen	320 ± 33	———
	25	124 552 ± 4 567	389,02
	10	117 831 ± 4 846	368,03
	5	59 007 ± 9 812	184,30

Anmerkungen zu Tabelle 1:
PHA zeigte in allen Versuchen eine stimulierende Wirkung, deren Optimum stets bei einer Konzentration von 25 bzw. 10 µg/ml lag.
Diese Schwankung scheint in Abhängigkeit vom Lösungszeitpunkt des PHA zu stehen, da beobachtet werden konnte, daß das Optimum stets bei 10 µg/ml lag, wenn frisch aufgelöstes PHA verwendet wurde.

Tabelle 2: Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus der Schweinemilz durch PHA

Versuchs-datum	PHA-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
21. 3. 77	- Zellkontrollen	186 - 5	——
	25	624 ± 64	3,35
	10	416 ± 36	2,23
	1	207 ± 15	1,11
	0,5	157 ± 12	0,84
	0,05	154 ± 17	0,83
26.10. 77	- Zellkontrollen	232 ± 10	——
	25	47 199 ± 3 106	203,01
	10	51 749 ± 1 932	222,57
	5	40 078 ± 5 195	172,38
	1	9 101 ± 1 463	39,14
	0,5	13 201 ± 2 832	56,78
	0,05	286 ± 59	1,23
3.11. 77	- Zellkontrollen	294 ± 3	——
	25	15 583 ± 1 456	53,00
	10	12 335 ± 890	41,96
	5	11 031 ± 1 092	37,52
22.11. 77	- Zellkontrollen	361 ± 56	——
	25	1 351 ± 166	3,74
	10	8 882 ± 372	24,58
	5	6 760 ± 616	18,71
	1	1 094 ± 153	3,03

Anmerkungen zu Tabelle 2:
Die Stimulierbarkeit aus der Milz isolierter Schweinelymphocyten durch PHA erweist sich als ebenso regelmäßig wie die der aus dem Blut isolierten Zellen. Das Stimulationsoptimum liegt ebenfalls bei einer PHA-Konzentration von 25 bzw. 10 µg/ml, wobei der gleiche Zusammenhang mit dem Lösungszeitpunkt des PHA festzustellen war.

Tabelle 3: Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus dem strömenden Rinderblut durch PHA

Versuchs-datum	PHA-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
7. 3. 77	- Zellkontrollen	618 ± 128	———
	25	405 ± 110	0,66
	10	563 ± 110	0,91
	1	361 ± 62	0,58
	0,5	353 ± 34	0,57
	0,05	174 ± 27	0,28
31. 5. 77	- Zellkontrollen	228 ± 14	———
	50	371 ± 14	1,63
	25	418 ± 25	1,84
	10	2 021 ± 463	8,88
	5	5 976 ± 863	26,25
	1	644 ± 9	2,83
	0,5	462 ± 12	2,03
	0,05	323 ± 110	1,42
6. 6. 77	- Zellkontrollen	384 ± 57	———
	25	181 ± 9	0,47
	10	568 ± 107	1,48
	5	1 601 ± 358	4,17
	1	1 020 ± 70	2,81
	0,5	896 ± 147	2,33
	0,05	182 ± 33	0,47

Fortsetzung Tabelle 3:

Versuchs-datum	PHA-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
13. 6. 77	- Zellkontrollen	386 ± 62	———
	50	782 ± 256	2,03
	25	974 ± 140	2,52
	10	1 084 ± 325	2,81
	5	3 805 ± 70	9,85
	1	1 570 ± 190	4,06
	0,5	674 ± 160	1,74

Anmerkungen zu Tabelle 3:
Aus Rinderblut isolierte Lymphocyten waren nur in einem Teil der ausgeführten Versuche durch PHA zu stimulieren. In allen positiven Versuchen lag das Stimulationsoptimum bei einer PHA-Konzentration von 5 µg/ml. Die erreichten Indices waren deutlich niedriger als bei der Stimulierung von Schweinelymphocyten durch PHA.

Tabelle 4: Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus der Rindermilz durch PHA

Versuchs-datum	PHA-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
10.10.77	- Zellkontrollen	503 ± 37	——
	50	1 435 ± 161	2,85
	25	1 452 ± 119	2,88
	10	3 783 ± 662	7,51
	5	2 564 ± 231	5,09
	1	1 242 ± 398	2,47
	0,5	1 009 ± 207	2,00
	0,05	871 ± 139	1,73
25.10.77	- Zellkontrollen	443 ± 89	——
	10	606 ± 55	1,36
	5	519 ± 65	1,17
20. 6.78	- Zellkontrollen	383 ± 47	——
	10	2 387 ± 712	6,23
2.10.78	- Zellkontrollen	488 ± 94	——
	50	1 070 ± 131	2,19
	25	612 ± 95	1,25
	10	1 881 ± 334	3,85
	5	995 ± 230	2,04
	1	768 ± 249	1,57
	0,5	553 ± 97	1,13
	0,05	346 ± 17	0,71

Anmerkungen zu Tabelle 4:
Auch aus der Milz isolierte Rinderlymphocyten waren nicht in allen Versuchen durch PHA stimulierbar. Die in positiven Versuchen erreichten Indices sind wiederum wesentlich niedriger als bei Schweinelymphocyten.
Das Konzentrationsoptimum lag bei 10 µg PHA / ml.

Tabelle 5: Mitogene Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus dem strömenden Schweineblut durch Concanavalin A (ConA)

Versuchs-datum	ConA-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
1. 2.77	- Zellkontrollen	710 ± 79	———
	25	5 916 ± 2 028	8,33
	10	2 343 ± 489	3,30
	2	1 064 ± 550	1,50
	1	612 ± 165	0,86
8. 2.77	- Zellkontrollen	1 438 ± 663	———
	25	41 683 ± 28 431	29,00
	10	25 316 ± 4 949	17,61
	1	424 ± 103	0,30
	0,5	547 ± 14	0,38
	0,05	1 232 ± 674	0,68
28. 2.77	- Zellkontrollen	635 ± 238	———
	25	12 084 ± 770	19,03
	10	7 651 ± 3 281	12,05
	1	837 ± 212	1,32
	0,5	377 ± 45	0,59
	0,05	746 ± 189	1,17
4. 4.77	- Zellkontrollen	752 ± 170	———
	100	5 472 ± 696	7,27
	50	10 819 ± 1 942	14,38
	25	19 972 ± 1 254	26,55

Fortsetzung Tabelle 5:

Versuchs-datum	ConA-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
5. 4.77	- Zellkontrollen	492 ± 63	——
	100	6 776 ± 249	13,76
	50	11 817 ± 1 087	24,00
	25	20 643 ± 881	41,92
17.10.77	- Zellkontrollen	320 ± 33	——
	50	40 893 - 7 473	127,72
	25	92 208 - 3 862	288,00
	10	68 525 - 9 482	214,03
	5	26 468 - 1 677	28,67

Anmerkungen zu Tabelle 5:
In allen Versuchen ergaben sich positive Stimulationsindices bei ConA-Konzentrationen von 10 / 25 / 50 und 100 µg/ml. Das Optimum lag bei 25 µg/ml.

Tabelle 6: Mitogene Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus der Schweinemilz durch ConA

Versuchs-datum	ConA-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
21. 3.77	- Zellkontrollen	186 ± 5	——
	100	252 ± 17	1,35
	50	182 ± 68	0,91
	10	500 ± 168	2,69
26.10.77	- Zellkontrollen	232 ± 10	——
	100	1 002 ± 79	4,31
	25	15 540 ± 2 603	66,84
	10	75 748 ± 7 026	325,80
	5	51 311 ± 3 436	220,69
	1	2 119 ± 252	9,11
	0,5	1 079 ± 85	4,64
	0,05	290 ± 16	1,25
3.11.77	- Zellkontrollen	294 ± 3	——
	50	457 ± 61	1,56
	25	1 587 ± 431	5,40
	10	5 756 ± 239	19,58
	5	3 537 ± 73	12,03
22.11.77	- Zellkontrollen	361 ± 56	——
	25	7 806 ± 261	21,60
	10	6 500 ± 293	17,99
	5	4 385 ± 247	12,14
	1	1 354 ± 62	3,75

Anmerkungen zu Tabelle 6:
Bei der Stimulierung aus der Milz isolierter Schweinelymphocyten durch ConA wurden die höchsten Indices bevorzugt bei einer ConA-Konzentration von 10 µg/ml erreicht.

Tabelle 7: Mitogene Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus dem strömenden Rinderblut durch ConA

Versuchs-datum	ConA-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
18. 4.77	- Zellkontrollen	200 ± 15	——
	100	319 ± 15	1,60
	50	1 613 ± 402	8,08
	25	1 285 ± 193	6,44
25. 4.77	- Zellkontrollen	222 ± 25	——
	100	296 ± 43	1,34
	50	237 ± 5	1,07
	25	390 ± 99	1,76
	10	433 ± 34	1,95
31. 5.77	- Zellkontrollen	228 ± 14	——
	100	469 ± 55	2,06
	50	670 ± 184	2,94
	25	4 424 ± 236	19,43
	10	4 066 ± 1 598	17,86
	5	4 518 ± 366	19,84
	1	373 ± 22	1,64
	0,5	511 ± 108	2,24
	0,05	268 ± 46	1,18
13. 6.77	- Zellkontrollen	386 ± 62	——
	50	481 ± 49	1,25
	25	839 ± 229	2,17
	10	2 258 ± 163	5,85
	5	2 037 ± 289	5,28
	1	489 ± 52	1,27

Fortsetzung Tabelle 7:

Versuchs-datum	ConA-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
6. 6.77	- Zellkontrollen	384 ± 57	——
	100	458 ± 88	1,19
	50	1 707 ± 391	4,44
	25	1 310 ± 448	3,41
	10	3 558 ± 576	9,26
	5	1 133 ± 223	2,95
	1	295 ± 58	0,77
	0,5	260 ± 28	0,68
20. 6.77	- Zellkontrollen	378 ± 62	——
	50	9 510 ± 2 263	25,16
	25	14 530 ± 1 818	38,45
	10	25 710 ± 1 391	68,03
	5	21 803 ± 937	57,69
	1	5 730 ± 522	15,16

Anmerkungen zu Tabelle 7:
Die aus dem Blut isolierten Rinderlymphocyten weisen in ihrer Stimulierbarkeit durch ConA sehr hohe individuelle Schwankungen auf. In positiven Versuchen lagen die günstigsten ConA-Konzentrationen bei 5 / 10 / 25 und 50 µg/ml.

Tabelle 8: Mitogene Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus der Rindermilz durch ConA

Versuchs-datum	ConA-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
10.10.77	- Zellkontrollen	503 ± 37	——
	100	368 ± 92	0,73
	50	623 ± 101	1,24
	25	650 ± 16	1,29
	10	6 626 ± 391	13,16
	5	2 972 ± 266	5,90
	1	857 ± 67	1,70
	0,5	560 ± 141	1,11
	0,05	934 ± 25	1,86
25.10.77	- Zellkontrollen	443 ± 89	——
	25	314 ± 31	0,71
	10	504 ± 101	1,14
	5	538 ± 234	1,22
12. 9.77	- Zellkontrollen	312 ± 34	——
	100	501 ± 89	1,60
	50	848 ± 93	2,71
	25	1 210 ± 229	3,87
	10	1 352 ± 153	4,33
	5	1 318 ± 45	4,22
	1	912 ± 114	2,92
	0,5	734 ± 95	2,35
	0,05	721 ± 76	2,31

Anmerkungen zu Tabelle 8:
Auch die Stimulierbarkeit aus der Milz isolierter Rinder-Lymphocyten durch ConA zeigt große individuelle Unterschiede.
In den positiven Versuchen erwiesen sich 10 µg/ml als günstigste Konzentration.

Tabelle 9: Mitogene Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus dem strömenden Schweineblut durch Pokeweed-Mitogen (PWM)

Versuchs-datum	PWM-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
4. 4.77	- Zellkontrollen	752 ± 170	——
	100	26 400 ± 1 146	35,09
	50	18 563 ± 149	24,61
	25	20 722 ± 2 851	27,54
	10	21 480 ± 1 256	28,55
	1	8 634 ± 968	11,48
	0,5	9 711 ± 1 401	12,91
	0,05	2 602 ± 230	3,46
5. 4.77	- Zellkontrollen	492 ± 63	——
	100	18 976 ± 870	58,84
	50	22 394 ± 1 571	45,48
	25	26 002 ± 768	52,80
	10	13 993 ± 1 228	28,42
	1	17 093 ± 1 366	34,71
	0,5	11 123 ± 2 050	22,59
	0,05	2 412 ± 393	4,90
17. 5.77	- Zellkontrollen	140 ± 24	——
	100	27 486 ± 1 328	195,71
	50	30 272 ± 3 129	215,55
	25	46 667 ± 3 978	332,29
	10	39 992 ± 6 329	284,77
	1	30 226 ± 4 863	215,23
	0,5	18 451 ± 1 667	131,38
	0,05	1 146 ± 335	8,16

Fortsetzung Tabelle 9:

Versuchs-datum	PWM-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
23. 5.77	- Zellkontrollen	222 ± 22	——
	100	25 826 ± 1 595	116,56
	50	20 457 ± 1 093	92,33
	25	32 122 ± 1 218	144,98
	10	30 605 ± 2 480	138,13
	1	8 790 ± 409	39,67
	0,5	6 431 ± 552	29,03
	0,05	623 ± 102	2,81
17.10.77	- Zellkontrollen	320 ± 33	——
	100	7 595 ± 2 455	23,72
	50	38 607 ± 4 662	120,58
	25	53 386 ± 3 204	166,74
	10	68 901 ± 12 693	215,20
	5	64 221 ± 3 246	200,59

Anmerkungen zu Tabelle 9:
In allen vorliegenden Versuchen kommt eine hohe Stimulierbarkeit durch PWM zum Ausdruck.
Eine deutliche Stimulation der Schweinelymphocyten erfolgt bereits ab 0,5 µg PWM/ml, das Maximum wird bei 25 µg/ml erreicht und dann bei 50 und 100 µg/ml beibehalten.

Tabelle 10: Mitogene Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus der Schweinemilz durch PWM

Versuchs-datum	PWM-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
26.10.77	- Zellkontrollen	232 ± 10	——
	100	493 ± 147	2,12
	50	13 599 ± 1 940	58,49
	5	34 362 ± 5 977	147,79
	1	14 705 ± 1 907	63,25
	0,5	13 376 ± 2 290	57,53
	0,05	429 ± 34	1,58
3.11.77	- Zellkontrollen	294 ± 3	——
	50	6 901 ± 108	23,47
	25	7 097 ± 241	24,14
	10	4 167 ± 83	14,17
	5	2 968 ± 197	10,10
	1	1 149 ± 27	3,91
	0,5	678 ± 47	2,31
	0,05	310 ± 44	1,05
22.11.77	- Zellkontrollen	361 ± 56	——
	25	10 023 ± 107	27,74
	10	13 529 ± 880	37,44
	5	11 157 ± 492	30,88
	1	1 947 ± 189	5,39

Anmerkungen zu Tabelle 10:
Die Konzentrationsbreite von PWM zur Stimulierung von Schweinelymphocyten aus der Milz ist etwas geringer als bei den aus dem Blut isolierten Zellen.
Die höchsten Indices waren stets bei PWM-Konzentrationen von 5 / 10 / 25 / und 50 µg/ml zu verzeichnen, ein eindeutiges Konzentrationsoptimum dagegen nicht festzustellen.

Tabelle 11: Mitogene Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus dem strömenden Rinderblut durch PWM

Versuchs-datum	PWM-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
18. 4.77	- Zellkontrollen	200 ± 15	——
	100	2 931 ± 639	14,67
	50	3 501 ± 1 428	17,53
	25	816 ± 142	4,09
	10	3 560 ± 1 566	17,82
	1	1 345 ± 335	6,73
	0,5	1 051 ± 191	5,26
	0,05	1 222 ± 193	6,12
25. 4.77	- Zellkontrollen	222 ± 25	——
	100	510 ± 59	2,30
	50	295 ± 17	1,33
	25	605 ± 103	2,37
	10	383 ± 46	1,72
	1	197 ± 34	0,89
	0,5	230 ± 76	1,04
	0,05	160 ± 20	0,72
31. 5.77	- Zellkontrollen	228 ± 14	——
	100	10 423 ± 1 954	45,78
	50	11 774 ± 461	51,71
	25	10 639 ± 2 729	46,73
	10	7 054 ± 624	30,98
	1	6 442 ± 933	28,30
	0,5	2 753 ± 119	12,09
	0,05	361 ± 63	1,58

Fortsetzung Tabelle 11:

Versuchs-datum	PWM-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
6. 6.77	- Zellkontrollen	384 ± 57	——
	100	2 879 ± 1 104	7,49
	50	1 865 ± 182	4,85
	25	4 505 ± 887	11,73
	10	3 855 ± 288	10,03
	1	3 850 ± 116	10,02
13. 6.77	- Zellkontrollen	386 ± 62	——
	50	1 344 ± 98	3,48
	25	895 ± 106	2,32
	10	1 140 ± 14	2,95
	1	515 ± 89	1,33
	0,5	373 ± 33	0,97
	0,05	194 ± 34	0,50
20. 6.77	- Zellkontrollen	378 ± 62	——
	50	11 594 ± 698	30,68
	25	11 215 ± 961	29,68
	10	10 479 ± 608	27,73
	5	11 894 ± 824	31,47
	1	11 010 ± 1 628	29,13
6. 9.77	- Zellkontrollen	335 ± 33	——
	50	2 213 ± 1 389	6,60
	25	858 ± 163	2,56
	10	1 019 ± 39	3,04
	5	1 184 ± 230	3,53
	1	713 ± 59	2,13

Anmerkungen zu Tabelle 11:
Wie bei der Stimulierung durch ConA zeigen sich auch in den Versuchen mit PWM sehr große individuelle Unterschiede in der Stimulierbarkeit von Rinderlymphocyten.
Auffällig ist, daß das Maximum in positiven Versuchen bereits bei einer PWM-Konzentration von 1 µg/ml erreicht und in annähernd gleicher Höhe bei 5 / 10 / 25 und 50 µg/ml gehalten wird.

Tabelle 12: Mitogene Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus der Rindermilz durch PWM

Versuchs-datum	PWM-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
10.10.77	- Zellkontrollen	503 ± 37	——
	100	494 ± 172	0,98
	50	713 ± 139	1,42
	25	1 407 ± 210	2,79
	10	4 900 ± 1 677	9,73
	5	2 485 ± 493	4,94
	1	1 984 ± 218	3,94
	0,5	1 221 ± 216	2,42
	0,05	1 839 ± 190	3,65
25.10.77	- Zellkontrollen	443 ± 89	——
	50	847 ± 57	1,91
	25	719 ± 36	1,62
	10	549 ± 87	1,23
	5	765 ± 5	1,72
	1	400 ± 42	0,90
	0,5	566 ± 140	1,27
	0,05	420 ± 20	0,94
12. 9.78	- Zellkontrollen	312 - 34	——
	100	1 265 - 222	4,05
	50	1 352 - 90	4,33
	25	1 075 - 68	3,44
	10	699 - 129	2,24
	5	787 - 35	2,52
	1	578 - 33	1,85
	0,5	764 - 114	2,44
	0,05	437 - 53	1,40

Anmerkungen zu Tabelle 12:
Die Stimulierbarkeit aus der Milz isolierter Rinderlymphocyten variiert ebenfalls individuell sehr stark. Ein Konzentrationsoptimum konnte anhand der ausgeführten Versuche nicht festgestellt werden.

Tabelle 13: Mitogene Stimulierbarkeit von Schweinelymphocyten aus dem strömenden Blut durch Lipopolysaccharide W Salmonella typhosa (LPS)

Versuchsdatum	LPS-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
8. 2.77	- Zellkontrollen	1 438 ± 663	——
	positive Kontrollen ConA 10	25 316 ± 4 949	17,61
	100	2 201 ± 111	1,53
	10	1 720 ± 663	1,20
	2,5	1 962 ± 159	1,36
	0,5	1 779 ± 109	1,24
	0,05	738 ± 221	0,51
4. 4.77	- Zellkontrollen	752 ± 170	——
	positive Kontrollen PWM 10	21 480 ± 1 256	28,55
	3 200	765 ± 47	1,02
	1 600	572 ± 41	0,67
	800	678 ± 110	0,90
	400	482 ± 19	0,64
	200	425 ± 24	0,57
	20	400 ± 34	0,53
5. 4.77	- Zellkontrollen	492 ± 63	——
	positive Kontrollen PWM 10	13 993 ± 1 228	28,42

Fortsetzung Tabelle 13:

Versuchs-datum	LPS-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
5. 4.77	3 200	788 ± 31	1,60
	1 600	696 ± 118	1,41
	800	546 ± 47	1,11
	400	469 ± 58	0,95
	200	409 ± 12	0,83
	20	294 ± 29	0,60
17.10.77	- Zellkontrollen	320 ± 33	——
	positive Kontrollen PWM 25	53 386 ± 3 204	166,74
	5	420 ± 7	1,31
	1	412 ± 52	1,29
	0,5	442 ± 57	1,38
	0,05	438 ± 62	1,37

Anmerkungen zu Tabelle 13:
LPS zeigt in keiner der verwendeten Konzentrationen eine stimulierende Wirkung auf Lymphocyten, die aus Schweineblut isoliert wurden.

Tabelle 14: Mitogene Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus der Schweinemilz durch LPS

Versuchs-datum	LPS-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
26.10.77	- Zellkontrollen	232 ± 10	——
	1 600	843 ± 76	3,62
	800	1 526 ± 353	6,56
	400	942 ± 26	4,05
	20	634 ± 103	2,73
	1	662 ± 103	2,85
	0,5	420 ± 41	1,81
5.11.77	- Zellkontrollen	202 ± 20	——
	3 200	210 ± 21	1,04
	1 600	215 ± 13	1,06
	800	210 ± 24	1,04
	400	358 ± 82	1,77
	200	201 ± 34	0,99
	20	230 ± 34	1,14
	5	378 ± 21	1,87
	1	371 ± 19	1,83
	0,5	274 ± 29	1,35
22.11.77	- Zellkontrollen	361 ± 56	——
	3 200	351 ± 82	0,97
	1 600	425 ± 48	1,18
	800	574 ± 50	1,59
	400	436 ± 53	1,21
	200	690 ± 134	1,91
	20	397 ± 38	1,10
	5	319 ± 40	0,88
	1	337 ± 66	0,93
	0,5	197 ± 20	0,55

Fortsetzung Tabelle 14:

Versuchs-datum	LPS-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
26. 6.78	- Zellkontrollen	270 ± 42	———
	3 200	869 ± 95	3,22
	1 600	1 075 ± 49	3,98
	800	1 125 ± 114	4,17
	400	613 ± 42	2,77
	200	777 ± 25	2,88
	20	489 ± 60	1,81
	5	471 ± 22	1,74
	1	458 ± 46	1,69

Anmerkungen Tabelle 14:
Nur bei einem Teil der ausgeführten Versuche war durch LPS eine mitogene Stimulierung aus der Milz isolierter Schweinelymphocyten zu erzielen und zwar bei LPS-Konzentrationen von 400 / 800 / 1600 / und 3200 µg/ml.
Die Reproduzierbarkeit positiver Indices ist auch durch die Tabellen 25 und 37
aus Trennungsversuchen belegt.

Tabelle 15: Mitogene Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus dem strömenden Rinderblut durch LPS

Versuchs-datum	LPS-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	si
18. 4.77	- Zellkontrollen	200 ± 15	——
	positive Kontrollen PWM 1	1 345 ± 335	6,73
	3 200	300 ± 10	1,50
	1 600	288 ± 17	1,44
	800	280 ± 29	1,40
	400	235 ± 23	1,18
	200	373 ± 206	1,87
6. 6.77	- Zellkontrollen	384 ± 57	——
	positive Kontrollen PWM 1	3 850 ± 116	10,02
	3 200	231 ± 27	0,60
	1 600	463 ± 21	1,20
	800	258 ± 24	0,67
	400	298 ± 33	0,78
	200	480 ± 19	1,25
	20	237 ± 23	0,62
	5	221 ± 24	0,58
	1	469 ± 12	1,22
	0,5	363 ± 14	0,95
	0,05	320 ± 39	0,83

Fortsetzung Tabelle 15:

Versuchs-datum	LPS-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
13. 6.77	- Zellkontrollen	386 ± 62	——
	positive Kontrollen PHA 5	3 805 ± 70	9,85
	3 200	370 ± 97	0,96
	1 600	323 ± 18	0,84
	800	393 ± 73	1,02
	400	315 ± 67	0,81
	200	299 ± 15	0,78
	20	306 ± 36	0,97
	5	468 ± 110	1,21
	1	291 ± 35	0,75
	0,5	222 ± 9	0,57
	0,05	460 ± 22	1,19

Anmerkungen zu Tabelle 15:
LPS war in keiner der verwendeten Konzentrationen fähig, aus dem Blut isolierte Rinderlymphocyten zu stimulieren.

Tabelle 16: Mitogene Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus der Rindermilz durch LPS

Versuchs-datum	LPS-Konzentration in µg/ml	cpm $\bar{x} \pm$ se	si
10.10.77	- Zellkontrollen	503 ± 37	——
	3 200	1 706 ± 453	3,39
	1 600	1 899 ± 289	3,77
	800	10 037 ± 631	19,93
	400	5 165 ± 2 152	10,26
	200	5 389 ± 1 282	10,70
	20	2 472 ± 627	4,91
	5	1 493 ± 164	2,97
	1	1 182 ± 331	2,35
	0,5	1 070 ± 169	2,13
	0,05	1 498 ± 23	2,97
25.10.77	- Zellkontrollen	443 ± 89	——
	3 200	699 ± 90	1,57
	1 600	684 ± 57	1,54
	800	382 ± 1	0,86
	400	637 ± 61	1,43
	200	292 ± 24	0,65
	20	367 ± 43	0,82
	5	453 ± 79	1,02
	0,5	559 ± 136	1,26
	0,05	439 ± 90	0,99
7. 9.78	- Zellkontrollen	319 ± 35	——
	1 600	1 126 ± 161	3,53
	800	1 317 ± 87	4,13
	400	696 ± 110	2,18

Anmerkungen zu Tabelle 16:
Ebenso wie Schweinelymphocyten konnten auch Rinderlymphocyten, die aus der Milz isoliert waren, nur bei einem Teil der ausgeführten Versuche durch LPS stimuliert werden. Die günstigsten Konzentrationen lagen bei 200 / 400 / 800 und 1 600 µg/ml.
Auch hier konnten positive Ergebnisse in Trennungsversuchen (Tabelle 41)
reproduziert werden.

Tabelle 17: Beziehungen zwischen Höhe der Zelleinsaat, Höhe der cpm $\bar{x}$ der Zellkontrollen und Höhe der Stimulationsindices von PHA, ConA und PWM bei der Stimulierung von Schweinelymphocyten aus dem strömenden Blut.

Mitogen µg/ml	Zelleinsaat 7 x 10^5/ml cpm $\bar{x} \pm$ se	si	Zelleinsaat 3,5 x 10^5/ml cpm $\bar{x} \pm$ se	si	Zelleinsaat 14 x 10^5/ml cpm $\bar{x} \pm$ se	si
- Zell-kontrollen	362 ± 33	——	413 ± 32	——	489 ± 87	——
PHA 10	35 348 ± 3 176	97,67	35 746 ± 3 882	86,63	54 131 ± 5 079	111,43
ConA 10	96 745 ± 12 371	267,32	44 584 ± 3 803	108,05	69 722 ± 12 238	143,52
PWM 10	34 761 ± 4 031	96,05	16 795 ± 1 563	40,70	32 108 ± 4 098	66,09
- Zell-kontrollen	507 ± 99	——	479 ± 117	——	263 ± 23	——
PHA 10	82 977 ± 5 596	163,76	31 700 ± 2 872	66,12	117 618 ± 5 884	447,39
ConA 10	43 945 ± 2 068	86,73	23 255 ± 4 100	48,51	76 010 ± 8 954	289,12
PWM 10	29 560 ± 1 854	58,42	13 036 ± 1 989	27,19	58 364 ± 7 134	222,00

Anmerkung zu Tabelle 17:
Weder Halbierung noch Verdopplung der üblichen Höhe der Zelleinsaat von 3,5 x 10^5/ml führten zu signifikanten Veränderungen in der Höhe der cpm $\bar{x}$ der Zellkontrollen.
Dagegen konnte bei Halbierung der Zellzahl eine Erniedrigung aller Stimulationsindices festgestellt werden, während bei Verdopplung der Zellzahl wieder ein Anstieg - in einem Versuch sogar deutlich über die Indices der üblichen Zellzahl hinaus - zu verzeichnen ist.

Tabelle 18: Beziehungen zwischen Höhe der Zelleinsaat, Höhe der cpm $\bar{x}$ der Zellkontrollen und Höhe der Stimulationsindices von PHA, ConA und PWM bei der Stimulierung von Rinderlymphocyten aus dem strömenden Blut.

Mitogen µg/ml	Zelleinsaat 7 x 10^5/ml cpm $\bar{x} \pm$ se	si	Zelleinsaat 3,5 x 10^5/ml cpm $\bar{x} \pm$ se	si	Zelleinsaat 14 x 10^5/ml cpm $\bar{x} \pm$ se	si
- Zell-kontrollen	335 ± 44	——	396 ± 87	——	364 ± 81	——
PHA 5	824 ± 157	2,46	449 ± 56	1,14	285 ± 94	0,78
ConA 10	1 197 ± 351	3,57	534 ± 172	1,35	356 ± 24	0,98
PWM 10	483 ± 76	1,44	428 ± 60	1,08	1 425 ± 429	3,91
- Zell-kontrollen	253 ± 12	——	281 ± 39	——	177 ± 14	——
PHA 5	250 ± 48	0,99	279 ± 125	0,99	417 ± 95	2,35
ConA 10	425 ± 93	1,68	246 ± 32	0,87	539 ± 108	3,04
PWM 10	296 ± 53	1,17	284 ± 85	1,01	218 ± 33	1,23

Anmerkung zu Tabelle 18:

Ebenso wie bei Schweinelymphocyten führte auch bei Rinderlymphocyten weder Halbierung noch Verdopplung der Zellzahl zu signifikanten Unterschieden in den cpm $\bar{x}$ der Zellkontrollen.

Auch bei Rinderlymphocyten kam es bei halber Zellzahl zum Absinken, bei doppelter meist wieder zum Anstieg der Stimulationsindices, z. T. auch hier über die Höhe der Indices hinaus, die bei der üblichen Zellzahl erreicht wurden.

Tabelle 19: Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus dem strömenden Schweineblut ohne und mit Vorbehandlung durch Neuraminidase

Mitogen µg/ml	Lymphocyten unbehandelt cpm $\bar{x} \pm$ se	si	mit Neuraminidase vorbehandelt cpm $\bar{x} \pm$ se	si
- Zell-kontrollen	206 ± 35	——	599 ± 73	——
PWM 10	45 101 ± 4 347	218,76	12 948 ± 1 007	21,62
5	36 402 ± 783	176,57	18 298 ± 836	30,55
ConA 25	35 718 ± 1 109	173,25	4 412 ± 764	7,37
PHA 25	95 234 ± 9 485	461,93	18 048 ± 3 252	30,13
10	134 191 ± 2 935	650,89	56 034 ± 3 095	93,55
LPS 800	613 ± 46	2,97	353 ± 6	0,59
400	718 ± 30	3,48	332 ± 36	0,55
- Zell-kontrollen	350 ± 32	——	394 ± 91	——
PWM 10	10 081 ± 1 097	28,78	4 408 ± 1 587	11,18
ConA 25	7 492 ± 555	21,39	3 573 ± 636	9,06
PHA 10	13 599 ± 2 596	38,82	4 347 ± 1 001	11,02
LPS 800	418 ± 103	1,19	261 ± 47	0,66

Anmerkung zu Tabelle 19:
Bei den mit Neuraminidase behandelten Schweinelymphocyten ist ein deutlicher Abfall der Stimulationsindices aller verwendeten Mitogene zu verzeichnen.

Tabelle 20: Stimulierbarkeit von Rinderlymphocyten aus dem strömenden Blut ohne und mit Vorbehandlung durch Neuraminidase

Mitogen µg/ml	Lymphocyten unbehandelt cpm $\bar{x} \pm$ se	si	mit Neuraminidase vorbehandelt cpm $\bar{x} \pm$ se	si
- Zell-kontrollen	646 ± 66	——	361 ± 20	——
PWM 10	1 806 ± 361	2,80	810 ± 172	2,24
ConA 10	7 539 ± 2 704	11,67	3 479 ± 709	9,63
PHA 5	1 353 ± 588	2,09	729 ± 35	2,02
LPS 800	796 ± 201	1,23	658 ± 52	1,82
400	482 ± 107	0,75	377 ± 31	1,04
- Zell-kontrollen	330 ± 48	——	342 ± 38	——
PWM 10	2 133 ± 451	6,46	2 223 ± 234	6,50
ConA 10	5 179 ± 711	15,69	4 245 ± 614	12,41
PHA 5	1 014 ± 135	3,07	916 ± 108	2,68
LPS 800	426 ± 72	1,29	362 ± 63	1,06

Anmerkung zu Tabelle 20:
Die Stimulationsindices der mit Neuraminidase vorbehandelten Rinderlymphocyten zeigen - im Gegensatz zu Schweinelymphocyten - nur geringfügige und somit nicht signifikante Abweichungen von den Indices der unbehandelten Zellen.

Tabelle 21: Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus dem strömenden Schweineblut ohne und mit Vorbehandlung durch Carbonyleisenpulver.

Mitogen µg/ml	Lymphocyten unbehandelt cpm $\bar{x} \pm$ se	si	mit Carbonyleisenpulver behandelt cpm $\bar{x} \pm$ se	si
- Zellkontrollen	258 ± 31	——	514 ± 125	——
PHA 10	87 599 ± 3 588	340,06	55 004 ± 7 422	107,10
ConA 10	50 688 ± 11 895	196,77	47 362 ± 13 292	92,22
PWM 10	5 085 ± 348	19,74	17 845 ± 823	34,75
- Zellkontrollen	362 ± 33	——	269 ± 18	——
PHA 10	35 348 ± 3 176	97,67	35 055 ± 9 251	130,03
ConA 10	96 745 ± 12 371	267,32	24 126 ± 4 574	89,49
PWM 10	34 761 ± 4 031	96,05	12 192 ± 1 143	45,22

Anmerkung zu Tabelle 21:
Auch nach Reduzierung des Anteils von Makrophagen durch die Behandlung mit Carbonyl-Eisenpulver zeigten aus dem strömenden Blut isolierte Schweinelymphocyten noch eine starke Reaktion auf PHA, ConA und PWM.

Tabelle 22: Stimulierbarkeit von Lymphocyten aus dem strömenden Rinderblut ohne und mit Vorbehandlung mit Carbonyleisenpulver.

Mitogen µg/ml	Lymphocyten unbehandelt cpm $\bar{x} \pm$ se	si	mit Carbonyleisenpulver behandelt cpm $\bar{x} \pm$ se	si
- Zellkontrollen	305 ± 52	——	285 ± 43	——
PHA 5	793 ± 212	2,60	1 114 ± 139	3,91
ConA 10	3 671 ± 730	12,02	1 544 ± 174	5,42
PWM 10	554 ± 80	1,82	251 ± 16	0,88
- Zellkontrollen	335 ± 44	——	296 ± 10	——
PHA 5	824 ± 157	2,46	745 ± 53	2,52
ConA 10	1 197 ± 351	3,57	995 ± 35	3,36
PWM 10	483 ± 76	1,44	372 ± 59	1,26

Anmerkung zu Tabelle 22:
Nach der Reduzierung der Makrophagen durch die Behandlung mit Carbonyleisenpulver ist keine signifikante Änderung der Stimulierbarkeit aus dem Blut isolierter Rinderlymphocyten durch PHA, ConA und PWM festzustellen.

3.2.2. Differenzierung von Lymphocyten

3.2.2.1. Bildung von E-Rosetten

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus dem Schweineblut:

Mittelwert: 26,64 %

Standardabweichung: ± 4,45

Einzelergebnisse in %: 30 / 24 / 22 / 22 / 22 / 26 / 30 / 19 / 25 / 32 / 34 / 30 / 29 / 28

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus der Schweinemilz:

Mittelwert: 33,60 %

Standardabweichung: ± 11,86

Einzelergebnisse in %: 29 / 34 / 28 / 31 / 33 / 34 / 20 / 22 / 27 / 19 / 38 / 41 / 31 / 56 / 61

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus dem Rinderblut und der Rindermilz:

In keinem der ausgeführten Versuche war eine E-Rosetten-Bildung mit Rinderlymphocyten zu erzielen.

Bildung von E-Rosetten nach Vorbehandlung der Schaferythrocyten mit Neuraminidase

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus dem Schweineblut:

42 % (26); 42 % (27); 35 % (28)

In Klammern sind jeweils die Ergebnisse des gleichen Versuchs ohne Vorbehandlung der Erythrocyten angegeben.

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus der Schweinemilz:

38 % (32); 41 % (27); 44 % (29)

Die Anzahl der E-Rosetten bildenden Schweinelymphocyten ist nach der Behandlung der Schaferythrocyten mit Neuraminidase deutlich erhöht.

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus dem Rinderblut:

Mittelwert: 15,91 %

Standardabweichung: $\pm$ 4,32

Einzelergebnisse in %: 13 / 17 / 11 / 14 / 23 / 22 / 16 / 14 / 21 / 13 / 11

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus der Rindermilz:

Mittelwert: 14,56

Standardabweichung: $\pm$ 4,56

Einzelergebnisse in %: 10 / 11 / 16 / 19 / 11 / 17 / 23 / 14 / 10

Erst durch die Vorbehandlung der Schaferythrocyten konnte eine Bildung von E-Rosetten mit Rinderlymphocyten erreicht werden.

Bildung von E-Rosetten nach Vorbehandlung der Lymphocyten mit Neuraminidase

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus dem Schweineblut:

27 % (28); 23 % (22); 28 % (30)

In Klammern sind die Ergebnisse des gleichen Versuchs ohne Vorbehandlung der Lymphocyten angegeben.

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus der Schweinemilz:

30 % (32); 28 % (28); 27 % (25)

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus dem Rinderblut:

0 % (0); 4 % (0); 0 % (0)

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus der Rindermilz:

0 % (0); 0 % (0); 0 % (0)

Weder bei Schweine- noch bei Rinderlymphocyten war nach der Behandlung der Lymphocyten mit Neuraminidase eine signifikante Änderung des Anteils E-Rosetten bildender Zellen zu verzeichnen.

Bildung von E-Rosetten nach der Behandlung von Lymphocyten und Erythrocyten mit Neuraminidase

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus dem Schweineblut:

49 % (31/43); 42 % (28/35)

In Klammern sind jeweils die Ergebnisse aus den gleichen Versuchen ohne Vorbehandlung bzw. mit Vorbehandlung der Erythrocyten mit Neuraminidase angegeben.

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus der Schweinemilz:

49 % (32/38); 47 % (29/36)

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus dem Rinderblut:

31 % (0/13); 27 % (0/11)

Weitere Einzelergebnisse in %: 29 / 34 / 36 / 22 / 29 / 30 / 27 / 29

Mittelwert: 29,40 %

Standardabweichung: $\pm$ 3,86

Anteil der E-Rosetten bildenden Lymphocyten aus der Rindermilz:

28 % (0/10); 24 % (0/11)

Weitere Einzelergebnisse: 30 / 30 / 32 / 28 / 27 / 29

Mittelwert: 28,50 %

Standardabweichung: $\pm$ 2,39

Durch die Behandlung von Lymphocyten und Erythrocyten mit Neuraminidase ist bei Rinderlymphocyten nochmals ein deutlicher, bei Schweinelymphocyten nur ein geringer Anstieg des prozentualen Anteils E-Rosetten bildender Lymphocyten festzustellen.

3.2.2.2. Bildung von EAC-Rosetten

Anteil der EAC-Rosetten bildenden Lymphocyten aus dem Schweineblut:
Einzelergebnisse in %: 8 / 13 / 14 / 11 / 10 / 8 / 6 / 4 / 9 / 12 / 11 / 13 / 9
Mittelwert: 9,85 %
Standardabweichung: ± 2,91

Anteil der EAC-Rosetten bildenden Lymphocyten aus der Schweinemilz:
Einzelergebnisse in %: 16 / 26 / 13 / 21 / 26 / 50 / 18 / 27 / 22 / 19 / 12 / 22 / 19 / 21
Mittelwert: 22,29 %
Standardabweichung: ± 9,17

Anteil der EAC-Rosetten bildenden Lymphocyten aus dem Rinderblut:
Einzelergebnisse in %: 23 / 36 / 15 / 21 / 18 / 15 / 15 / 12 / 13 / 16 / 31
Mittelwert: 19,55 %
Standardabweichung: ± 7,70

Anteil der EAC-Rosetten bildenden Lymphocyten aus der Rindermilz:
Einzelergebnisse in %: 18 / 19 / 21 / 24 / 19 / 19 / 24 / 14 / 28 / 24
Mittelwert: 21,00 %
Standardabweichung: ± 4,03

Bildung von EAC-Rosetten nach Behandlung der Schaferythrocyten mit Neuraminidase

Weder für Schweine- noch für Rinderlymphocyten kann eine Aussage über die EAC-Rosettenbildung unter diesen Versuchsbedingungen gemacht werden, da sie zu Formationen so zahlreicher Erythrocyten führten, in deren Zentrum nur in den wenigsten Fällen ein Lymphocyt zu identifizieren war, sodaß nicht geklärt werden konnte, ob diese Formationen EAC-Rosetten oder lediglich Aggregatbildungen von Schaferythrocyten darstellen.

3.2.2.3. Anteil der fluoreszierenden Zellen nach der Behandlung der Lymphocyten mit FITC-Protein A

Anteil fluoreszierender Lymphocyten aus dem Schweineblut:
Einzelergebnisse in %: 14 / 5 / 11 / 13 / 9 / 7 / 12 / 12 / 6 / 7 / 10 / 5 / 12 / 8
Mittelwert: 9,36 %
Standardabweichung: ± 3,05

Anteil fluoreszierender Lymphocyten aus der Schweinemilz:
Einzelergebnisse in %: 25 / 33 / 27 / 27 / 28 / 43 / 26 / 28 / 14 / 19 / 23 / 29 / 37 / 15 / 17
Mittelwert: 26,07 %
Standardabweichung: ± 7,94

Anteil fluoreszierender Lymphocyten aus dem Rinderblut:
Einzelergebnisse in %: 4 / 9 / 3 / 8 / 10 / 12 / 13 / 8
Mittelwert: 8,38 %
Standardabweichung: ± 3,50

Anteil fluoreszierender Lymphocyten aus der Rindermilz:
Einzelergebnisse in %: 23 / 33 / 29 / 31 / 29 / 20 / 12 / 19 / 20 / 42
Mittelwert: 25,80 %
Standardabweichung: ± 8,65

3.2.3. Trennung von Lymphocyten

3.2.3.1. Trennung von Lymphocyten mittels E-Rosettensedimentation

Tabelle 23: Differenzierung der Gesamtpopulation und der bei der E-Rosettensedimentation nicht sedimentierten Lymphocyten aus dem Schweineblut.

	Versuch I	Versuch II
Zellzahl vor der Sedimentation	$3{,}9 \times 10^8$	$2{,}9 \times 10^8$
Ausbeute nicht sedimentierter Zellen	$7{,}5 \times 10^6$	$9{,}8 \times 10^6$
E-Rosetten Gesamtlymphocyten	25 %	32 %
nicht sedimentierte Zellen	6 %	4 %
EAC-Rosetten Gesamtlymphocyten	10 %	8 %
nicht sedimentierte Zellen	93 %	84 %
IF-positiv Gesamtlymphocyten	kein	7 %
nicht sedimentierte Zellen	Ergebnis	53 %

IF = Immunofluoreszenz

Wegen zu geringer Zellausbeute konnte kein ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit durchgeführt werden.

Tabelle 24: Differenzierung der Gesamtpopulation und der bei der E-Rosettensedimentation nicht sedimentierten Lymphocyten aus der Schweinemilz.

	Versuch I	Versuch II
Zellzahl vor der Sedimentation	6×10^8	$2{,}8 \times 10^8$
Ausbeute nicht sedimentierter Zellen	9×10^7	$3{,}0 \times 10^7$
E-Rosetten Gesamtlymphocyten	38 %	41 %
nicht sedimentierte Zellen	7 %	5 %
EAC-Rosetten Gesamtlymphocyten	19 %	21 %
nicht sedimentierte Zellen	96 %	97 %
IF-positiv Gesamtlymphocyten	14 %	19 %
nicht sedimentierte Zellen	36 %	86 %

Tabelle 25: ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit der Gesamtpopulation und der bei der E-Rosettensedimentation nicht sedimentierten Lymphocyten aus der Schweinemilz.

Mitogen µg/ml	Gesamtlymphocyten cpm $\bar{x} \pm$ se	si	nicht sedimentierte cpm $\bar{x} \pm$ se	si
- Zellkontrollen	299 ± 33	——	294 ± 16	——
PHA 10	45 245 ± 5 566	151,17	1 355 ± 121	4,60
ConA 25	15 290 ± 5 236	51,09	347 ± 69	1,18
PWM 5	894 ± 168	2,99	245 ± 51	0,83
LPS 800	485 ± 93	1,62	536 ± 39	1,82
400	463 ± 64	1,55	372 ± 43	1,62
- Zellkontrollen	313 ± 38	——	311 ± 37	——
PHA 10	38 838 ± 512	124,24	4 246 ± 144	13,66
ConA 25	17 101 ± 2 718	54,71	426 ± 43	1,37
PWM 25	7 266 ± 643	23,25	549 ± 61	1,77
LPS 800	738 ± 52	2,36	1 282 ± 244	4,12
400	867 ± 117	2,77	1 115 ± 82	3,59

Anmerkungen zu den Tabellen 23 bis 25:
Bei allen ausgeführten Versuchen mit Schweinelymphocyten sprechen die Ergebnisse der Nachweismethoden für eine deutliche Anreicherung von B-Lymphocyten nach der E-Rosettensedimentation: Der Anteil der E-Rosetten bildenden Zellen sank im Vergleich zu den Ergebnissen der Gesamtlymphocytenpopulation
von 25 bzw. 32 % auf 6 bzw. 4 % bei Lymphocyten aus dem Schweineblut
von 38 bzw. 41 % auf 7 bzw. 5 % bei Lymphocyten aus der Schweinemilz,
während der Anteil der EAC-Rosetten bildenden Zellen
von 10 bzw. 8 % auf 93 bzw. 84 % bei Lymphocyten aus dem Schweineblut
von 19 bzw. 21 % auf 96 bzw. 97 % bei Lymphocyten aus der Schweinemilz
anstieg.

Ebenso war eine deutliche Erhöhung des Anteils der nach der Behandlung mit FITC-Protein A fluoreszierenden Zellen von 7 auf 53 % bei Lymphocyten aus dem Schweineblut und von 14 bzw. 19 % auf 36 bzw. 86 % bei Lymphocyten aus der Schweinemilz
zu verzeichnen.

Der ^{14}C-Thymidintest ergab nach der Fraktionierung sehr stark erniedrigte, aber noch positive Stimulationsindices mit PHA, keine Stimulierbarkeit durch Con A und PWM, sowie einen leichten Anstieg der Indices bei LPS.

Tabelle 26: Differenzierung der Gesamtpopulation und der bei der E-Rosettensedimentation nicht sedimentierten Lymphocyten aus dem Rinderblut.

	Versuch I	Versuch II
Zellzahl vor der Sedimentation	$1,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$
Ausbeute nicht sedimentierter Zellen	$1,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
E-Rosetten Gesamtlymphocyten	14 %	19 %
nicht sedimentierte Zellen	3 %	2 %
EAC-Rosetten Gesamtlymphocyten	18 %	13 %
nicht sedimentierte Zellen	84 %	81 %
IF-positiv Gesamtlymphocyten	4 %	6 %
nicht sedimentierte Zellen	1 %	3 %

Der ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit konnte wegen zu geringer Zellausbeute nicht durchgeführt werden.

Tabelle 27: Differenzierung der Gesamtpopulation und der bei der E-Rosettensedimentation nicht sedimentierten Lymphocyten aus der Rindermilz.

	Versuch I	Versuch II
Zellzahl vor der Sedimentation	$3{,}5 \times 10^8$	$5{,}5 \times 10^8$
Ausbeute nicht sedimentierter Zellen	5×10^7	$4{,}8 \times 10^7$
E-Rosetten Gesamtlymphocyten	21 %	23 %
nicht sedimentierte Zellen	4 %	3 %
EAC-Rosetten Gesamtlymphocyten	16 %	21 %
nicht sedimentierte Zellen	84 %	81 %
IF-positiv Gesamtlymphocyten	8 %	18 %
nicht sedimentierte Zellen	2 %	10 %

Tabelle 28: ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit der Gesamtpopulation und der bei der E-Rosettensedimentation nicht sedimentierten Lymphocyten aus der Rindermilz.

Mitogen µg/ml	Gesamtlymphocyten cpm $\bar{x} \pm$ se	si	nicht sedimentierte cpm $\bar{x} \pm$ se	si
- Zellkontrollen	358 ± 86	——	310 ± 39	——
PHA 10	213 ± 35	0,60	340 ± 32	1,10
ConA 10	242 ± 18	0,68	431 ± 72	1,39
PWM 10	198 ± 13	0,55	393 ± 68	1,27
LPS 800	306 ± 84	0,85	720 ± 77	2,32
400	379 ± 50	1,06	683 ± 74	2,21
- Zellkontrollen	367 ± 64	——	271 ± 39	——
PHA 10	300 ± 24	0,82	236 ± 17	0,87
ConA 10	348 ± 39	0,95	509 ± 87	1,88
PWM 10	355 ± 33	0,97	307 ± 56	1,13
LPS 800	315 ± 30	0,86	621 ± 67	2,29
400	379 ± 28	1,03	590 ± 61	2,18

Anmerkungen zu den Tabellen 26 bis 28:
Ebenso wie bei Schweinelymphocyten sinkt auch bei Rinderlymphocyten aus dem strömenden Blut wie aus der Milz der Anteil E-Rosetten bildender Zellen in der Fraktion nicht sedimentierter Zellen gegenüber der Gesamtpopulation stark ab und zwar
von 14 bzw. 19 % der Gesamtlymphocyten aus dem Blut
auf 3 bzw. 2 % und
von 21 bzw. 23 % der Gesamtlymphocyten aus der Milz
auf 4 bzw. 3 %
der nicht sedimentierten Zellen.

Gleichfalls ist ein hoher Anstieg des Anteils EAC-Rosetten bildender Zellen
von 18 bzw. 13 %
auf 84 bzw. 81 % bei Lymphocyten aus dem strömenden Blut und
von 16 bzw. 21 %
auf 84 bzw. 81 % der aus der Milz isolierten Zellen zu verzeichnen.

Der Anteil nach der Behandlung mit FITC-Protein A fluoreszierender Zellen war jedoch entgegen den Ergebnissen der Schweinelymphocyten in der Fraktion nicht sedimentierter Zellen gegenüber der Gesamtpopulation stets erniedrigt.

Im ^{14}C-Thymidintest erwiesen sich in allen Versuchen die Lymphocyten der Gesamtpopulation als "Nichtreagenten" gegenüber PHA, Con A, PWM und LPS; eine signifikante Erhöhung der Stimulationsindices in der Fraktion nicht sedimentierter Zellen konnte nur durch LPS erzielt werden.

3.2.3.2. Trennung von Lymphocyten mittels Affinitäts-chromatographie in Helix pomatia Lektin-Säulen

Tabelle 29: Differenzierung der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus dem Schweineblut sowie der Fraktionen (F_1 - F_3) nach Durchfluß der Zellen durch Helix pomatia Lektin-Säulen.

Lymphocyten mit Neuraminidase vorbehandelt				ohne Neuraminidase
	Versuch I	II	III	IV
Zelleinsaat	$8{,}4 \times 10^7$	$8{,}0 \times 10^7$	$10{,}0 \times 10^7$	$9{,}0 \times 10^7$
Ausbeute F_1	$4{,}5 \times 10^7$	$4{,}5 \times 10^7$	$9{,}5 \times 10^7$	$6{,}5 \times 10^7$
F_2	$3{,}0 \times 10^7$	$1{,}0 \times 10^7$	0	0
F_3	0	0	0	0
E-Rosetten G	26 %	26 %	27 %	31 %
F_1	29 %	2 %	36 %	29 %
F_2	0 %	0 %	——	——
F_3	——	——	——	——
EAC-Rosetten G	6 %	4 %	9 %	12 %
F_1	7 %	0 %	16 %	11 %
F_2	8 %	50 %	——	——
F_3	——	——	——	——
IF-positiv G	——	5 %	12 %	12 %
F_1	——	4 %	0 %	11 %
F_2	——	12 %	——	——
F_3	——	——	——	——

Tabelle 30: ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus dem Schweineblut sowie der Fraktionen (F_1 und F_2) nach Durchfluß der Zellen durch Helix pomatia Lektin-Säulen.

Versuch I	G	F_1	F_2
cpm $\bar{x}$ der Zellkontrollen	562	154	260
si PWM 5 µg/ml	59,23	2,57	1,00
si PHA 10 µg/ml	93,14	4,88	1,20
si ConA 25 µg/ml	152,70	3,00	1,14
Versuch II			
cpm $\bar{x}$ der Zellkontrollen	326	189	——
si PWM 5 µg/ml	39,08	5,14	——
si PHA 10 µg/ml	16,78	9,85	——
si ConA 25 µg/ml	110,24	9,11	——

In den Versuchen III und IV konnte kein ^{14}C-Thymidintest durchgeführt werden, da die Zellen nach der Säulenpassage unsteril waren.

Tabelle 31: Differenzierung der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus der Schweinemilz sowie der Fraktionen (F_1 - F_3) nach Durchfluß der Zellen durch Helix pomatia Lektin-Säulen.

		Versuch I	II	III	IV
Zelleinsaat		$8{,}4 \times 10^7$	$9{,}8 \times 10^7$	10×10^7	10×10^7
Ausbeute	F_1	$2{,}5 \times 10^7$	$4{,}5 \times 10^7$	$7{,}5 \times 10^7$	7×10^7
	F_2	$1{,}0 \times 10^7$	10^6	0	0
	F_3	$1{,}2 \times 10^7$	10^6	0	0
E-Rosetten	G	20 %	34 %	34 %	22 %
	F_1	24 %	1 %	42 %	23 %
	F_2	1 %	——	——	——
	F_3	5 %	——	——	——
EAC-Rosetten	G	26 %	50 %	18 %	27 %
	F_1	16 %	10 %	16 %	25 %
	F_2	0 %	——	——	——
	F_3	6 %	——	——	——
IF-positiv	G	——	43 %	26 %	28 %
	F_1	——	90 %	0 %	23 %
	F_2	——	——	——	——
	F_3	——	——	——	——

Der ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit der Lymphocyten konnte in keinem der Versuche durchgeführt werden, da die Zellen nach der Säulenpassage stests unsteril waren.

Anmerkungen zu den Tabellen 29 bis 31:

Nach Durchfluß durch Helix pomatia Lektin-Säulen ist weder bei Schweinelymphocyten aus dem strömenden Blut noch aus der Milz die erfolgreiche Fraktionierung oder Anreicherung einer bestimmten Zellpopulation zu erkennen.

Tabelle 32: Differenzierung der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus dem Rinderblut, sowie der Fraktionen (F_1 - F_3) nach Durchfluß der Zellen durch Helix pomatia Lektin-Säulen.

Versuch	I	II	III
Zelleinsaat	$8{,}0 \times 10^7$	$8{,}0 \times 10^7$	$10{,}0 \times 10^7$
Ausbeute F_1	$0{,}4 \times 10^7$	$6{,}0 \times 10^7$	$0{,}6 \times 10^7$
F_2	10^6	$0{,}6 \times 10^7$	0
F_3	0	0	0
E-Rosetten G	26 %	22 %	22 %
F_1	5 %	24 %	6 %
F_2	——	53 %	——
EAC-Rosetten G	16 %	15 %	18 %
F_1	42 %	12 %	54 %
F_2	——	26 %	——
IF-positiv G	9 %	3 %	11 %
F_1	69 %	2 %	53 %
F_2	——	30 %	——

Tabelle 33: Differenzierung der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus der Rindermilz, sowie der Fraktionen (F_1 - F_3) nach Durchfluß der Zellen durch Helix pomatia Lektin-Säulen.

Versuch	I	II	III
Zelleinsaat	$10,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$	$10,0 \times 10^7$
Ausbeute F_1	$4,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$
F_2	10^6	$0,3 \times 10^7$	0
F_3	0	0	0
E-Rosetten G	23 %	26 %	21 %
F_1	4 %	23 %	5 %
F_2	——	19 %	——
EAC-Rosetten G	28 %	24 %	26 %
F_1	48 %	21 %	51 %
F_2	——	18 %	——
IF-positiv G	29 %	31 %	29 %
F_1	65 %	28 %	59 %
F_2	——	20 %	——

Der ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit konnte wegen zu geringer Zellausbeute oder Unsterilität der Zellen in keinem der Versuche durchgeführt werden.

Anmerkungen zu den Tabellen 32 und 33:
Im Gegensatz zu Schweinelymphocyten sprechen die Ergebnisse aus 4 der 6 Versuche mit Rinderlymphocyten für eine erfolgreiche Fraktionierung der Zellen in Helix pomatia Lektin-Säulen mit einer deutlichen Anreicherung von B-Zellen in der Fraktion ungebundener Zellen (F_1). Sowohl aus dem Blut als auch aus der Milz isolierte Rinderlymphocyten zeigten in F_1 gegenüber der Gesamtpopulation ein klares Absinken des Prozentsatzes E-Rosetten, dagegen einen starken Anstieg EAC-Rosetten bildender, sowie nach der Behandlung mit Protein A fluoreszierender Zellen.

3.2.3.3. Trennung von Lymphocyten mittels Nylonfaser-Säulen

Tabelle 34: Differenzierung der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus dem Schweineblut, sowie der Fraktion (F) nicht adhäsiver Zellen nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen.

Versuch	I	II	III
Säulenpassage	1x	2x	2x
Zelleinsaat	$11{,}0 \times 10^7$	$15{,}0 \times 10^7$	$14{,}0 \times 10^7$
Ausbeute F	$3{,}0 \times 10^7$	$4{,}0 \times 10^7$	$3{,}8 \times 10^7$
E-Rosetten G	30 %	29 %	28 %
F	36 %	52 %	46 %
EAC-Rosetten G	11 %	13 %	9 %
F	3 %	0 %	0 %
IF-positiv G	8 %	11 %	7 %
F	1 %	0 %	1 %

Tabelle 35: ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus dem Schweineblut, sowie der Fraktion (F) nicht adhäsiver Zellen nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen.

	Versuch I		Versuch III	
	G	F	G	F
cpm $\bar{x}$ der Zellkontrollen	304	853	283	486
si PHA 10 µg/ml	309,72	140,90	235,29	160,88
si ConA 25 µg/ml	97,46	41,68	253,72	143,45
si PWM 5 µg/ml	54,05	35,84	13,87	10,33

Tabelle 36: Differenzierung der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus der Schweinemilz, sowie der Fraktion (F) nicht adhäsiver Zellen nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen.

Versuch	I	II	III a/b	III c/d
Säulenpassage	1x	2x	1x	2x
Zelleinsaat	$12,0x10^7$	$15,0x10^7$	2x $15,0x10^7$	2x $15,0x10^7$
Ausbeute F	$3,5x10^7$	$6,3x10^7$	a) $4,8x10^7$ b) $3,2x10^7$	c) $3,6x10^7$ d) $3,0x10^7$
E-Rosetten G	56 %	61 %	31 %	31 %
F	63 %	52 %	90 %	43 %
EAC-Rosetten G	22 %	19 %	22 %	22 %
F	9 %	15 %	5 %	9 %
IF-positiv G	26 %	17 %	15 %	15 %
F	16 %	12 %	3 %	11 %

In Versuch III a/b und III c/d wurden die Lymphocyten des gleichen Tieres verwendet und zwecks Gewinnung größerer Zellzahlen jeweils 2 Säulen damit beschickt, deren Ausbeute a) und b) bzw. c) und d) für die Nachweismethoden gepoolt wurde.

Tabelle 37: ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus der Schweinemilz, sowie der Fraktion (F) nicht adhäsiver Zellen nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen.

	Versuch I		III a/b		III c/d	
	G	F	G	F	G	F
cpm $\bar{x}$ der Zellkontrollen	156	189	392	508	392	440
si PHA 10 µg/ml	404,30	231,83	128,53	67,27	128,53	63,62
si ConA 10 µg/ml	697,27	5,13	164,79	29,79	164,79	72,89
si PWM 5 µg/ml	254,78	2,23	43,13	6,00	43,13	22,43
si LPS 800 µg/ml	3,54	1,27	1,91	0,90	1,91	1,48
si " 400 µg/ml	2,97	0,78	1,36	1,08	1,36	1,59

Anmerkung zu den Tabellen 34 bis 37:

Sowohl aus dem Blut als auch aus der Milz isolierte Schweinelymphocyten zeigten bei der Differenzierung des Eluats nicht adhäsiver Zellen nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen im Vergleich mit der Gesamtpopulation in einigen Versuchen nur eine leichte, in anderen jedoch eine deutliche Zunahme des Anteils der E-Rosetten bildenden Zellen.

Umgekehrt konnte in der Mehrzahl der ausgeführten Versuche ein deutlicher Abfall der Anzahl der EAC-Rosetten bildenden, sowie der im IF-Test mit Protein A positiven Zellen verzeichnet werden.

Diese Ergebnisse lassen auf eine Fraktionierung der Lymphocyten im Sinne einer starken Anreicherung von T-Zellen im Eluat schließen. Die im ^{14}C-Thymidintest mit PHA, ConA und PWM erzielten Stimulationsindices sind zwar bei den Zellen des Eluats gegenüber der Gesamtpopulation etwas erniedrigt, weisen diese Substanzen aber eindeutig als T-Zell wirksame Mitogene für Schweinelymphocyten aus.
Mit LPS konnte in keinem der Versuche eine Stimulierung nicht adhäsiver Zellen, jedoch auch nur in einem Fall die Stimulierung der Gesamtpopulation erreicht werden.

Die doppelte Säulenpassage der Zellen erwies sich nicht als günstig; die Ablösung adhäsiver Zellen gelang in keinem der Versuche.

Tabelle 38: Differenzierung der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus dem Rinderblut, sowie der Fraktion (F) nicht adhäsiver Zellen nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen.

Versuch	I a	I b	II a/b	III a/b
Säulenpassage	1x	2x	1x	1x
Zelleinsaat	$10,0x10^7$	$10,0x10^7$	2x $10,0x10^7$	2x $10,0x10^7$
Ausbeute F	$0,6x10^7$	$0,4x10^7$	a) $1,2x10^7$ b) $0,8x10^7$	a) $1,0x10^7$ b) $1,0x10^7$
E-Rosetten G	21 %	21 %	29 %	30 %
F	53 %	65 %	51 %	48 %
EAC-Rosetten G	13 %	13 %	15 %	12 %
F	2 %	3 %	2 %	6 %
IF-positiv G	12 %	12 %	13 %	8 %
F	1 %	1 %	0 %	2 %

In Versuch II und III wurden zwecks Gewinnung größerer Zellzahlen jeweils 2 Säulen (a und b) mit den Lymphocyten des gleichen Tieres beschickt und die Eluate a) und b) jeweils für die Nachweismethoden gepoolt.

Tabelle 39: Differenzierung der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus der Rindermilz, sowie der Fraktion (F) nicht adhäsiver Zellen nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen.

Versuch	I a	I b	II a/b	III a/b
Säulenpassage	1x	2x	1x	1x
Zelleinsaat	$10,0x10^7$	$10,0x10^7$	2x $15,0x10^7$	2x $10,0x10^7$
Ausbeute F	$3,0x10^7$	$1,4x10^7$	a) $6,0x10^7$ b) $5,0x10^7$	a) $1,8x10^7$ b) $2,4x10^7$
E-Rosetten G	32 %	32 %	28 %	27 %
F	56 %	51 %	58 %	56 %
EAC-Rosetten G	19 %	19 %	21 %	19 %
F	3 %	4 %	0 %	8 %
IF-positiv G	12 %	12 %	19 %	20 %
F	1 %	2 %	5 %	6 %

In den Versuchen II und III wurden zwecks Gewinnung größerer Zellzahlen jeweils 2 Säulen (a und b) mit den Lymphocyten des gleichen Tieres beschickt und die Eluate a) und b) jeweils für die Nachweismethoden gepoolt.

Tabelle 40: ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus dem Rinderblut, sowie der Fraktion (F) nicht adhäsiver Zellen nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen.

	Versuch II		Versuch III	
	G	F	G	F
cpm $\bar{x}$ der Zellkontrollen	163	274	257	282
si PHA 5 µg/ml	1,41	15,32	1,50	2,43
si ConA 10 µg/ml	2,82	26,19	2,53	3,09
si PWM 10 µg/ml	1,16	13,30	1,16	1,41

Tabelle 41: ^{14}C-Thymidintest zur Untersuchung der mitogenen Stimulierbarkeit der Gesamtpopulation (G) von Lymphocyten aus der Rindermilz, sowie der Fraktion (F) nicht adhäsiver Zellen nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen.

	Versuch I a		Versuch III	
	G	F	G	F
cpm $\bar{x}$ der Zellkontrollen	319	208	440	258
si PHA 10 µg/ml	1,05	1,40	4,10	1,77
si ConA 10 µg/ml	1,36	1,90	6,15	18,53
si PWM 10 µg/ml	0,91	1,36	1,48	1,40
si LPS 800 µg/ml	4,13	2,57	3,63	1,86

Anmerkungen zu den Tabellen 38 bis 41:

Auch bei der Differenzierung von Rinderlymphocyten zeigte sich bei dem Vergleich des Eluats nicht adhäsiver Zellen mit der Gesamtpopulation ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils der E-Rosetten bildenden, sowie ein deutlicher Abfall der EAC-Rosetten bildenden, wie der im IF-Test mit Protein A positiven Zellen, sodaß auch bei der Trennung von Rinderlymphocyten in Nylonfaser-Säulen das Eluat nicht adhäsiver Zellen als deutlich T-Zellen angereichert zu bezeichnen ist.

In allen Versuchen erwiesen sich die Lymphocyten der Gesamtpopulation als "Nichtreagenten" gegenüber PWM und in 3 der 4 Versuche gegenüber PHA und Con A. Dagegen konnte bei der Fraktion nicht adhäsiver Zellen in 3 von 4 Versuchen eine deutliche Reaktion auf Con A, in einem auf PHA und PWM verzeichnet werden, während die Stimulationsindices in den übrigen Versuchen zwar leicht, aber nicht signifikant anstiegen.

Die Frage der mitogenen Wirksamkeit auf T-Zellen des Rindes ist daher zunächst nur für Con A positiv zu beantworten und soll für PHA und PWM später diskutiert werden.

Eine Stimulierung aus der Milz isolierter Zellen durch LPS wurde nur mit der Gesamtpopulation erzielt, bei der Untersuchung der Fraktion nicht adhäsiver Zellen sanken die Indices deutlich ab.

Ein Vorteil doppelter Säulenpassage war nicht zu erkennen; die Ablösung adhäsiver Zellen gelang auch bei Rinderlymphocyten nicht.

4. Besprechung der Ergebnisse

Als Beitrag zur Ergänzung noch lückenhaft vorliegender Charakterisierungen der Lymphocytenpopulationen von Haussäugetieren, wurden die Lymphocyten von Schwein und Rind anhand mehrerer Kriterien, die sich als charakteristisch für einzelne Zellpopulationen des Menschen und der Maus erwiesen haben, untersucht.
Nach der Bestimmung der mitogenen Stimulierbarkeit der Gesamtpopulationen aus dem strömenden Blut, sowie der Milz und des Anteils von T- und B-Zellen an diesen Populationen anhand von E-Rosetten bzw. EAC-Rosetten und Ig-Rezeptoren, erfolgte die Trennung der Lymphocyten in Nylonfaser- und Helix pomatia Lektin-Säulen, sowie mittels E-Rosettensedimentation.

Die Anreicherung von T- bzw. B-Zellen in den einzelnen Fraktionen wurde wiederum mittels Rosettenbildung und Ig-Rezeptoren nachgewiesen und die Wirkung von Mitogenen auf die einzelnen Zellpopulationen geprüft.
Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen sollen der Übersicht wegen zunächst einzeln anhand zusammenfassender Tabellen besprochen werden.

Zum Vergleich der mitogenen Stimulierbarkeit von Schweine- und Rinderlymphocyten aus dem strömenden Blut (SBL bzw. RBL), sowie der Milz (SML bzw. RML), sind in Tabelle 4.1. die maximal erreichten Stimulationsindices sowie die jeweilige Mitogenkonzentration, bei der diese erreicht wurden, zusammengestellt.

Tabelle 4.1.

	SBL		SML		RBL		RML	
Mitogen	µg/ml	si	µg/ml	si	µg/ml	si	µg/ml	si
PHA	10	442,00	10	222,57	5	26,25	10	7,51
ConA	25	288,00	10	325,80	10	68,03	10	13,16
PWM	25	332,29	5	147,79	50	51,71	10	9,73
LPS	800	<3	800	6,65	800	<3	800	19,93

Als Gesamtpopulation zeigten Schweinelymphocyten aus dem Blut und aus der Milz in allen Versuchen sehr starke Reaktionen auf PHA, Con A und PWM, während SBL gar nicht, SML nur in einem Teil der Versuche durch LPS stimuliert werden konnten und zwar wesentlich geringer als durch die Phytomitogene.
Die Gesamtpopulation von Rinderlymphocyten aus Blut und Milz war dagegen nicht in allen ausgeführten Versuchen durch PHA, Con A und PWM stimulierbar und die in positiven Versuchen (Stimulationsindices deutlich größer als 3) erreichten Indices - bei RBL höher als bei RML - lagen insgesamt wesentlich unter den mit Schweinelymphocyten erreichten Werten, während RML stärker als SML durch LPS stimuliert wurden.

Die Behandlung der Lymphocyten durch Neuraminidase, die zu verschiedenen Veränderungen an Zellmembranen führen kann (UHLENBRUCK u. ROTHE 1974) zeigte keinen Einfluß auf die Stimulierbarkeit von Rinderlymphocyten, führte jedoch bei Schweinelymphocyten zu einem deutlichen Abfall der Stimulationsindices aller verwendeten Mitogene, sodaß hier eine Empfindlichkeit der Mitogenrezeptoren gegenüber Neuraminidase angenommen werden kann.

Das Vorkommen zahlreicher "Nichtreagenten", d. h. durch keine der mitogenen Substanzen stimulierbare Lymphocyten beim Rind, wurde zunächst als individuell bedingt gedeutet, konnte aber, da es sich bei den Spendertieren um anonyme Schlachttiere handelte, in keinen Zusammenhang gebracht werden. Diese Deutung erwies sich jedoch im Rahmen anderer Versuche, in denen das Blut lebender Tiere verwendet wurde, als nicht gerechtfertigt, da die Lymphocyten des gleichen Tieres in einigen Versuchen eine deutliche Stimulierbarkeit zeigten, sich in anderen dagegen als "Nichtreagenten" erwiesen, sodaß die Möglichkeit technisch bedingter Schwankungen in Erwägung gezogen werden muß.

Daß RBL bei der Isolierung über Ficoll-Isopaque zur Agglutination neigen, der Grund, aus dem FRUCHTMANN et al. (1977) diese Methode für RBL ablehnen, kann, obwohl die Agglutination in verschiedenen Versuchen ungleich stark auftritt, nicht als Ursache angesehen werden, da RML in den vorliegenden Versuchen niemals agglutinierten und trotzdem die gleichen Schwankungen in der Stimulierbarkeit wie RBL aufwiesen.
Vielmehr liegt der Verdacht nahe, daß es in einer der Stufen zur Isolierung von Rinderlymphocyten zu einer nicht beabsichtigten und ungleichen Fraktionierung mit Verminderung oder Anreicherung einer bestimmten Zellpopulation kam. So könnte z. B. die Zahl der Suppressor-T-Zellen, deren Verminderung einen Anstieg der Stimulierbarkeit zur Folge hat (FOLCH u. WAKSMAN, 1974), in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, eine Vermutung, die durch die Tatsachen, daß diese Zellen eine gewisse Glasadhärenz besitzen (BUNDSCHUH u. SCHNEEWEISS, 1976), sowie daß "Nichtreagenten" nach Durchfluß durch Nylonfasersäulen z. T. eine deutliche Reaktion auf PHA, Con A und PWM zeigten, zwar bekräftigt, wenngleich nicht bewiesen wird.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre in einer unterschiedlichen Verminderung der Zahl der ebenfalls adhäsiven Makrophagen zu sehen, deren Bedeutung allerdings bei der unspezifischen Transformation von Lymphocyten bisher noch umstritten ist.
Eine von Makrophagen unabhängige Stimulierbarkeit, die von GREAVES et al. (1974) für menschliche Lymphocyten beschrieben wurde, schien zunächst auch für Schweine- und Rinderlymphocyten dadurch bestätigt zu sein, daß nach Reduzierung des Anteils der Makrophagen mittels Carbonyleisenpulver von 9 - 12 % auf 4 - 6 % keine signifikanten Unterschiede in der Stimulierbarkeit festzustellen waren.
Diese Feststellung verliert jedoch ihre Beweiskraft für die von Makrophagen unabhängige Stimulierbarkeit auf Grund der

Untersuchungen von SCHLAAK (1975), der eine Steigerung der Transformationsrate menschlicher Lymphocyten bis zu einem Anteil von 5 % Makrophagen nachweisen konnte, während eine Erhöhung dieses Anteils keine weitere Steigerung zur Folge hatte.
Für eine Abhängigkeit der Stimulierbarkeit von einem Mindestanteil von Makrophagen im Sinne einer positiven Beeinflussung, die auch von CLINE u. SWEET (1968) bei der Stimulierung menschlicher Lymphocyten durch PHA beobachtet wurde, sprechen die Ergebnisse der Untersuchung nicht adhäsiver Schweinelymphocyten nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen, deren Stimulationsindices gegenüber der Gesamtpopulation stark erniedrigt waren, während ein z. T. deutlicher Anstieg der Stimulationsindices nicht adhäsiver Rinderlymphocyten eher einen hemmenden Einfluß von Makrophagen vermuten läßt.

Eine inhibierende Wirkung von Makrophagen, - die WALKER u. FOWLER (1965) auch bei der Stimulierung menschlicher Lymphocyten durch PHA nachwiesen -, und eine ungleiche Verminderung dieser Zellpopulation bei der Isolierung von Lymphocyten, könnte somit neben den Suppressorzellen als Ursache der unterschiedlichen Stimulierbarkeit von Rinderlymphocyten angesehen werden.

Einen Überblick über die Ergebnisse der Differenzierung von Schweine- und Rinderlymphocyten aus dem strömenden Blut (SBL bzw. RBL) sowie aus der Milz (SML bzw. RML) gibt die Tabelle 4.2., der gerundete Mittelwerte zugrunde gelegt und in der Tabelle 4.3. Vergleichswerte aus der Literatur gegenübergestellt sind.

Tabelle 4.2.

E-Rosetten	SBL	SML	RBL	RML
ohne Neuraminidasebehandlung	27 %	34 %	0 %	0 %
Erythrocyten mit Neuraminidase behandelt	40 %	41 %	16 %	15 %
Lymphocyten mit Neuraminidase behandelt	26 %	28 %	0 %	0 %
Erythrocyten u. Lymphocyten mit Neuraminidase behandelt	46 %	48 %	29 %	29 %
EAC-Rosetten	10 %	22 %	20 %	21 %
Ig-Rezeptoren mittels Protein A nachgewiesen	9 %	26 %	8 %	26 %

Tabelle 4.3.: Prozentualer Anteil der T- und B-Lymphocyten an der Lymphocytenpopulation des strömenden Blutes von Schwein und Rind, nachgewiesen anhand von E- bzw. EAC-Rosetten und Ig-Rezeptoren.

	T-Zellen	B-Zellen	Autoren
Schwein	89 %	30 %	KAUPP et al., 1977
	30 %		ESCAJADILLO u. BINNS, 1975
	32 %	12 %	TIZARD, 1977
Rind	32 %	32 %	GREWAL et al., 1976
	32 %	22 %	FRUCHTMANN et al., 1977
	30 %	20 %	TIZARD, 1977
		19 %	DE LIMA u. MITSCHERLICH, 1973

Anhand der durch die Behandlung von Erythrocyten und Lymphocyten maximal erzielten E-Rosetten von 46 % der SBL und 48 % der SML ergibt sich für Schweinelymphocyten ein etwa gleicher Anteil von T-Zellen an SBL und SML, der zwar sehr stark von den Angaben von KAUPP et al. (1977) abweicht, jedoch mit den Ergebnissen unbehandelter Zellen von ESCAJADILLO u. BINNS (1975) und TIZARD (1977) - hier 27 bzw. 34 % - annähernd übereinstimmt.
Während bei SBL die Anzahl EAC-Rosetten bildender, sowie nach Behandlung mit Protein A fluoreszierender Zellen mit 10 bzw. 9 % gleichgesetzt und ein Anteil von ca. 10 % B-Zellen angenommen werden kann - in Übereinstimmung mit der Angabe von TIZARD (1977) und differierend zu KAUPP et al. (1977) -, liegt bei SML eine leichte Diskrepanz zwischen 22 % EAC-Rosetten bildenden und 26 % nach Behandlung mit Protein A fluoreszierenden Zellen vor, die auf Ig-Rezepto-

ren einer geringen Anzahl von T-Zellen (MARCHALONIS et al., 1972) oder auf einen Anteil keine (PARISH u. HAYWARD, 1974) oder zu wenig C'_3-Rezeptoren (DUKOR et al., 1971) tragende B-Zellen zurückzuführen sein könnte.
Da diese Werte jedoch bei Betrachtung der Einzelergebnisse keine Signifikanz zeigen, erscheint es gerechtfertigt, unter Berücksichtigung beider Werte einen Anteil von ca. 24 % B-Zellen an SML anzunehmen.
Als Differenz zwischen 100 % und der Summe der ermittelten T- und B-Zellen ergibt sich ein relativ hoher Anteil von "Null-Zellen" mit 44 % der SBL, ein geringerer von 28 % der SML.

Auch Rinderlymphocyten zeigen in Blut und Milz einen gleichen Anteil nach Neuraminidasebehandlung maximal gebildeter E-Rosetten, der allerdings nur 29 % der Lymphocyten als T-Zellen ausweist, jedoch unter gleichen Bedingungen auch von GREWAL et al. (1976) und FRUCHTMANN et al. (1977) mit nur 32 % angegeben wird. Den leicht differierenden Werten von 21 % EAC-Rosetten bildenden und 26 % Ig-positiven RML kommt wie bei SML keine signifikante Bedeutung zu.
Unter Berücksichtigung beider Werte ist somit ebenfalls auf einen Anteil von ca. 24 % B-Zellen zu schließen.

Signifikante Unterschiede weisen dagegen die Anzahl von 20 % EAC-Rosetten bildenden, jedoch nur 8 % Ig-positiven RBL auf. Eine Erklärung dieser Diskrepanz könnte in der Tatsache gesehen werden, daß das zum Nachweis von Ig-Rezeptoren verwendete Protein A an F_c-Rezeptoren gebunden wird, die nach Untersuchungen von FRUCHTMANN et al. (1977) nur an einem Teil von B-Zellen aus dem RBL anhand der F_c-Rosettenbildung identifiziert werden konnten, sodaß F_c-Rezeptoren als Oberflächenmarker für B-Zellen - und damit Protein A zum Nachweis von Ig-Rezeptoren - als ungeeignet für RBL erscheinen.
Den wesentlich höheren Anteil von 32 % Ig positiven RBL wiesen GREWAL et al. (1976) mittels markiertem Kaninchen-anti-Rinder-Ig-Serum nach.

Die Deutung der niedrigen Werte Ig-positiver Zellen im Rinderblut muß nicht im Widerspruch zu den für EAC-Rosetten und Ig-Rezeptoren übereinstimmenden Ergebnissen der RML stehen, da in Milz und Blut die Mehrzahl der B-Zellen in verschiedenen Reifestadien vorliegen kann.
Unter diesen Voraussetzungen scheint es angebracht, der Bestimmung des Anteils von B-Zellen im strömenden Rinderblut aus den vorliegenden Versuchen ausschließlich den Prozentsatz von EAC-Rosetten in Höhe von 20 % zugrunde zu legen.
Entsprechende Werte - ebenfalls anhand von EAC-Rosetten ermittelt - geben TIZARD (1977) mit gleichfalls 20 %, FRUCHTMANN et al. (1977) mit 21,67 % und DE LIMA u. MITSCHERLICH (1973) mit 18,6 % an, wovon sich der letztgenannte Wert auf Rinder im 4. Lebensjahr bezieht, was etwa dem Schlachtalter der in dieser Arbeit benutzten Spendertiere entsprechen dürfte.
Aus den für T- und B-Zellen ermittelten Werten resultiert bei Rinderlymphocyten eine noch höhere Anzahl von "Null-Zellen" als bei Schweinelymphocyten, nämlich 51 % der RBL und 47 % der RML.

Einen Überblick über die Ergebnisse aus den Versuchen zur Trennung von Schweine- und Rinderlymphocyten in Nylonfaser-Säulen gibt die Tabelle 4.4., der wiederum gerundete Mittelwerte zugrunde gelegt sind.

Tabelle 4.4.

	SBL		SML		RBL		RML	
	gesamt	nicht adhäsive	gesamt	nicht adhäsive	gesamt	nicht adhäsive	gesamt	nicht adhäsive
E-Rosetten	29 %	45 %	45 %	62 %	25 %	54 %	30 %	55 %
EAC-Rosetten	11 %	1 %	22 %	9 %	13 %	3 %	20 %	4 %
Ig-Rezeptoren	9 %	1 %	18 %	10 %	11 %	1 %	13 %	3 %
Reaktion auf:								
PHA	+	+	+	+	-	±	±	-
Con A	+	+	+	+	-	+	±	±
PWM	+	+	+	+	-	±	-	-
LPS	n.u.	n.u.	+	-	n.u.	n.u.	+	-

n.u. = nicht untersucht

Bei Schweine- und Rinderlymphocyten zeichnet sich anhand des Anstiegs von E-Rosetten, sowie des Abfalls von EAC-Rosetten und von Ig-positiven Zellen gegenüber den entsprechenden Werten der Gesamtpopulation eine deutliche Anreicherung von T-Zellen im Eluat nicht adhäsiver Zellen ab und die geringe Zahl EAC-Rosetten bildender und Ig-positiver Zellen läßt sich sowohl als Verunreinigung mit B-Zellen als auch als Anteil C'_3- bzw. Ig-Rezeptoren tragender T-Zellen erklären.

Da sich nur die Hälfte der nicht adhäsiven Zellen als E-Rosetten bildend erwies, sodaß der Anteil an "Null-Zellen" nur geringfügig unter dem der Gesamtpopulation liegt, und zwar wie bei dieser in etwa gleicher Höhe bei RBL und RML, bei SML deutlich niedriger als bei SBL, kann auch dieser Anteil als nicht adhäsiv charakterisiert werden.

Während die Fraktion nicht adhäsiver SBL und SML in allen ausgeführten Versuchen durch PHA, Con A und PWM stimuliert und diese Substanzen damit eindeutig als auf T-Zellen wirkende Mitogene gegenüber Schweinelymphocyten nachgewiesen werden konnten, führten die Versuche mit Rinderlymphocyten zu stark differierenden Ergebnissen:
RBL, die sich als Gesamtpopulation in beiden ausgeführten Versuchen als "Nichtreagenten" erwiesen, konnten in der Fraktion nicht adhäsiver Zellen in einem der Versuche durch PHA, Con A und PWM, in dem anderen nur durch Con A deutlich stimuliert werden. RML dagegen zeigten sich in einem der Versuche sowohl als Gesamtpopulation, als auch in der Fraktion nicht adhäsiver Zellen als "Nichtreagenten", während im zweiten Versuch die Gesamtpopulation durch PHA und Con A, die Fraktion nicht adhäsiver Zellen nur durch Con A, aber erhöht stimulierbar war.
Diese Ergebnisse lassen eine eindeutige Aussage nur für Con A als T-Zellen stimulierendes Mitogen in Bezug auf Rinderlymphocyten zu, bestärken aber den Verdacht, daß es auf Grund der Adhäsivität von Makrophagen und Suppressorzellen zu einer in den einzelnen Versuchen unterschiedlichen Verringerung dieser Zellen und damit zur ungleichen Veränderung der Stimulierbarkeit der Rinderlymphocyten kam (FOLCH u. WAKSMAN, 1974; WALKER u. FOWLER, 1965).
LPS, das in der Gesamtpopulation von SML und RML positive Stimulationsindices zeigte, wies sich durch Abnahme der Indices in der Fraktion nicht adhäsiver Zellen bei beiden Species eindeutig als nicht auf T-Zellen wirkendes Mitogen aus.

Einen Überblick über die Ergebnisse aus Versuchen zur Trennung von Schweine- und Rinderlymphocyten mittels E-Rosetten-Sedimentation gibt die Tabelle 4.5. anhand gerundeter Mittelwerte.

Tabelle 4.5.

	SBL		SML		RBL		RML	
	gesamt	nicht sedi.	gesamt	nicht sedi.	gesamt	nicht sedi.	gesamt	nicht sedi.
E-Rosetten	29 %	5 %	40 %	6 %	17 %	2 %	22 %	3 %
EAC-Rosetten	9 %	88 %	20 %	96 %	16 %	82 %	19 %	82 %
Ig-Rezeptoren	7 %	53 %	17 %	61 %	5 %	2 %	13 %	6 %
Reaktion auf:								
PHA	n.u.	n.u.	+	+	n.u.	n.u.	-	-
Con A	"	"	+	-	"	"	-	-
PWM	"	"	+	-	"	"	-	-
LPS	"	"	-	+	"	"	-	+

nicht sedi. = nicht sedimentierte
n.u. = nicht untersucht

In der Fraktion nicht sedimentierter Zellen ist der Anteil an E-Rosetten bei Schweine- und Rinderlymphocyten auf maximal 6 % gegenüber minimal 17 % der Gesamtpopulation abgesunken, während der Anteil an EAC-Rosetten von maximal 20 % der Gesamtpopulation auf minimal 83 % in der Fraktion nicht sedimentierter Zellen anstieg.

Während bei Schweinelymphocyten gleichzeitig ein deutlicher - wenn auch nicht ganz so hoher - Anstieg Ig-positiver Zellen von 7 bzw. 17 % auf 53 bzw. 61 % zu verzeichnen ist, kam es bei Rinderlymphocyten sogar zu einem leichten Abfall von 5 bzw. 13 % Ig-positiven Zellen der Gesamtpopulation auf 2 bzw. 6 % der nicht sedimentierten Zellen, der allerdings so gering ist, daß ihm anhand der bereits besprochenen Schwierigkeiten, Ig-Rezeptoren an der Oberfläche von Rinderlymphocyten mittels Protein A nachzuweisen, keine Bedeutung zuzukommen scheint, sodaß auf Grund des Gesamtbildes bei Rinder- wie bei Schweinelymphocyten eine klare Anreicherung von B-Zellen in der Fraktion nicht sedimentierter Zellen angenommen werden kann.

Legt man bei der Berechnung der "Null-Zellen" für nicht sedimentierte Schweinelymphocyten wieder den Mittelwert aus EAC-Rosetten bildenden und Ig-positiven Zellen neben dem Anteil E-Rosetten bildender Zellen zugrunde, so ergibt sich wiederum mit 24 % ein höherer Anteil"Null-Zellen"an SBL, als mit 15 % der SML.
Diese relativ niedrigen Werte stehen allerdings - wie die Höhe der ermittelten Zahl von EAC-Rosetten, durch die sie bedingt sind - im Widerspruch zu der Tatsache, daß alle "Null-Zellen" als nicht E-Rosetten bildende Zellen zwangsläufig in der Fraktion nicht sedimentierter Zellen enthalten sein müßten und dort nicht an der Bildung von EAC-Rosetten beteiligt sein dürften.
Aus diesen Gründen erscheint es gerechtfertigt - oder zumindest zweckmäßig -, die Werte der EAC-Rosetten, wenngleich keine Begründung für deren Höhe gefunden werden konnte, als unbrauchbar anzusehen und nur den Anteil Ig-positiver Zellen in Höhe von 53 % der SBL bzw. 61 % der SML als in der Fraktion nicht sedimentierter Zellen nachgewiesener B-Zellen zu betrachten und neben dem Anteil E-Rosetten bildender Zellen der Berechnung von "Null-Zellen" zugrunde zu legen, wodurch sich 42 % der SBL und 33 % der SML als "Null-Zellen" in der Fraktion nicht sedimentierter Schweinelymphocyten erweisen würden.

Für Rinderlymphocyten kann anhand der gleichermaßen anzuzweifelnden Höhe EAC-Rosetten bildender Zellen, sowie der besprochenen Unbrauchbarkeit von Protein A zum Nachweis von Ig-Rezeptoren, keine Aussage über den Anteil von B- sowie "Null-Zellen" an der Fraktion nicht sedimentierter Zellen gemacht werden.

Eine deutliche Stimulierung von Schweinelymphocyten konnte in der Fraktion nicht sedimentierter SML (wegen zu geringer Zellausbeute konnten entsprechende Versuche mit SBL nicht durchgeführt werden) nur mit LPS und PHA erzielt werden, sodaß sich PHA hiermit im Gegensatz zu Con A und PWM, deren mitogene Wirkung nur für die Gesamtpopulation sowie auf die Fraktion nicht adhäsiver T-Zellen nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen nachgewiesen werden konnte, als nicht nur auf T-, sondern auch auf B-Zellen, LPS als ausschließlich auf B-Zellen wirksames Mitogen erweist.

Die Beurteilung der Stimulierbarkeit der mit B-Zellen angereicherten Fraktion nicht sedimentierter Rinderlymphocyten wird wie diejenige nicht adhäsiver Zellen nach Durchfluß durch Nylonfaser-Säulen dadurch erschwert, daß sich bereits die Zellen der Gesamtpopulation als "Nichtreagenten" gegenüber PHA, Con A und PWM erwiesen. Ein deutlicher Anstieg der Stimulationsindices gegenüber der Gesamtpopulation konnte nur bei der Verwendung von LPS beobachtet werden, das sich hiermit auch bei Rinderlymphocyten als ausschließlich B-Zellen wirksames Mitogen ausweisen dürfte.

Die Ergebnisse aus Versuchen zur Trennung von Rinderlymphocyten in Helix pomatia Lektin-Säulen sind in der Tabelle 4.6. als gerundete Mittelwerte zusammengefaßt.

Tabelle 4.6.

	RBL		RML	
	gesamt	ungebundene	gesamt	ungebundene
E-Rosetten	24 %	6 %	22 %	5 %
EAC-Rosetten	17 %	48 %	27 %	50 %
Ig-positiv	10 %	61 %	29 %	62 %

Die für Rinderlymphocyten vorliegenden Ergebnisse von 48 bzw. 50 % EAC-Rosetten und 61 bzw. 62 % Ig-positiven Zellen, zeigen eine deutliche Anreicherung von B-Zellen im Eluat ungebundener Zellen mit einer geringen Verunreinigung von 5 bzw. 6 % durch E-Rosettenbildung ausgewiesene T-Zellen.

Die gegenüber anderen Versuchen extrem hohe Anzahl mittels Protein A nachgewiesener Ig-Rezeptoren könnte darauf zurückzuführen sein, daß nur bei dieser Versuchsanordnung dieser Nachweis mit Lymphocyten geführt wurde, die zuvor mit Neuraminidase behandelt waren, die - ihrem günstigen Einfluß auf die E-Rosettenbildung entsprechend - hier eine Freilegung von Fc-Rezeptoren bewirkt haben könnte.

Den Diskrepanzen zwischen der Anzahl von E-Rosetten und Ig-positiven Zellen mag auch in diesen Versuchen das Fehlen nachweisbarer C'_3-Rezeptoren an einem Teil der B-Zellen zugrunde liegen (DUKOR et al. 1971).

Der Anteil von "Null-Zellen" an der Fraktion ungebundener Zellen in Höhe von 33 - 46 % der RBL und 33 - 45 % der RML (je nachdem, ob der Berechnung EAC-Rosetten oder Ig-positive Zellen zugrunde liegen) beweist, daß "Null-Zellen" auch keine Rezeptoren für Helix pomatia Lektin besitzen.

Da die Ergebnisse entsprechender Untersuchungen von Schweinelymphocyten nach Durchfluß durch Helix pomatia Lektin-Säulen sehr hohe Varianzen aufwiesen, ist es nicht zulässig, diese in einer Übersichtstabelle als Mittelwerte wiederzugeben.
Anhand aller in den Tabellen 29 - 31 vorliegenden Einzelergebnisse ließ sich keine eindeutige Anreicherung einer bestimmten Zellpopulation in den Eluaten nachweisen. Gegen die selektive Bindung spricht außerdem die Tatsache, daß bereits im ersten Eluat der frei durchgeflossenen Zellen über 50 % der Zelleinsaat enthalten war und zwar bei SBL und SML in gleicher Höhe, während bei den Versuchen mit Rinderlymphocyten, deren Ergebnisse dieses Eluat deutlich als mit B-Zellen angereichert ausweisen, die Ausbeute nur ca. 5 % der RBL und ca. 35 - 40 % der RML betrug.
Die Vermutung, daß evtl. auf der Oberfläche von Schweinelymphocyten vorhandene Helix pomatia Lektin-Rezeptoren durch die Behandlung mit Neuraminidase zerstört werden könnten - Mitogenrezeptoren auf Schweine- im Gegensatz zu Rinderlymphocyten hatten sich als empfindlich gegen Neuraminidase erwiesen - konnte nicht bestätigt werden.
Wenn auch das Haften von ca. 50 % der Schweinelymphocyten nicht als spezifische Bindung durch entsprechende Rezeptoren einer bestimmten Zellpopulation nachgewiesen werden konnte, bliebe die theoretische Möglichkeit, daß sowohl T- als auch B-Lymphocyten des Schweines Rezeptoren für Helix pomatia Lektin besitzen, sodaß dadurch keine Fraktionierung möglich ist, sondern lediglich nach Sättigung der Bindungskapazität von Helix pomatia Lektin "überschüssige" Zellen im Eluat ungebundener Zellen erscheinen.
Diese Theorie läßt sich jedoch rein quantitativ durch die Tatsache widerlegen, daß bei gleicher Höhe der Zelleinsaat ca. 95 % der RBL und 60 - 65 % der RML in der Säule gebunden werden konnten.

Bei einem Vergleich aller vorliegenden Ergebnisse mit entsprechenden Angaben über die Lymphocytenpopulationen des Menschen und der Maus, erweisen sich übereinstimmend Ig- und C'_3-Rezeptoren als Oberflächenmarker für B-Zellen; die Fähigkeit, mit Schaferythrocyten Spontanrosetten zu bilden (Rinderlymphocyten erst nach Behandlung der Erythrocyten mit Neuraminidase), als charakteristisch für T-Zellen. Rezeptoren für Helix pomatia Lektin dagegen konnten zwar wie auf T-Zellen des Menschen (HAMMARSTRÖM et al., 1973) und der Maus (HALLER et al., 1977) auch auf T-Zellen des Rindes, nicht jedoch auf Schweinelymphocyten nachgewiesen werden.

Während sich LPS bei der Stimulierung von Rinder- und Schweinelymphocyten ebenso wie für Lymphocyten des Menschen und der Maus als ausschließlich auf B-Zellen wirkend erwies, zeigte von den Phytomitogenen nur Con A (in löslicher Form verwendet) die gleiche selektive Wirkung auf T-Zellen des Rindes und des Schweines, wie auf T-Zellen des Menschen (GREAVES u. BAUMINGER, 1972) und der Maus (SELL, 1977; ANDERSSON et al., 1972).

In den Versuchen mit PHA dagegen, das für Mäuselymphocyten als B- und T-Zell- (SELL, 1977), für menschliche Lymphocyten überwiegend als T-Zell-Mitogen gilt (GREAVES et al., 1974), konnten zwar auch T- sowie B-Zellen des Schweines deutlich, jedoch B-Zellen des Rindes gar nicht und T-Zellen nur in einem Teil der ausgeführten Versuche durch PHA stimuliert werden, sodaß eine selektive Wirkung auf T-Zellen des Rindes anzunehmen, auf B-Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen ist.

Auf PWM, dessen mitogene Wirkung auf T- und B-Zellen des Menschen (BRITTINGER u. KÖNIG, 1969; MELLSTEDT, 1975) und der Maus (SHORTMAN et al. 1973; SELL, 1977) beschrieben wird, konnte weder bei Rinder- noch bei Schweinelymphocyten eine Reaktion von B-Zellen festgestellt werden. T-Zellen des Schweines waren immer, T-Zellen des Rindes waren nicht in allen Versuchen durch PWM stimulierbar.

Ein besonders auffälliger Unterschied zu den Angaben über die Lymphocytenpopulationen aus dem strömenden Blut des Menschen von ca. 85 % T-Zellen (SELL, 1977) und der Maus von 60 - 80 % T-Zellen (SELL, 1977; TIZARD, 1977) ist in dem wesentlich niedrigeren Anteil nachweisbarer T-Zellen an der Gesamtpopulation von Lymphocyten des Schweines und noch extremer des Rindes zu sehen, aus dem - bei einem etwa vergleichbaren Anteil von B-Zellen - im Gegensatz zu den Lymphocyten von Mensch und Maus, ein hoher Anteil von "Null-Zellen" resultiert.

5. Zusammenfassung

Schweine- und Rinderlymphocyten aus dem strömenden Blut und der Milz wurden über Ficoll-Isopaque isoliert.
Die Differenzierung der Zellen erfolgte anhand der Bildung von E- und EAC-Rosetten, sowie des Nachweises von Ig-Rezeptoren.

Aus der Gesamtpopulation von Lymphocyten aus dem strömenden Blut bzw. der Milz konnten 46 bzw. 48 % der Schweine- und jeweils 29 % der Rinderlymphocyten als T-Zellen und 10 bzw. 24 % der Schweine- sowie 20 bzw. 24 % der Rinderlymphocyten als B-Zellen identifiziert werden.

Eine Anreicherung von T-Zellen beider Spezies ließ sich im Eluat nicht adhäsiver Zellen nach Durchfluß der Lymphocyten durch Nylonfaser-Säulen, eine Anreicherung von B-Zellen mittels E-Rosettensedimentation in der Fraktion nicht sedimentierter Zellen erreichen.

Nach Durchfluß durch Helix pomatia Lektin-Säulen konnte nur bei Rinderlymphocyten eine Anreicherung von B-Zellen im Eluat ungebundener Zellen und damit eine spezifische Bindung von T-Zellen an Helix pomatia Lektin nachgewiesen werden.

Die Gesamtpopulation von Schweine- und Rinderlymphocyten sowohl aus der Milz, als auch aus dem strömenden Blut zeigten deutliche Reaktionen auf die Phytomitogene PHA, Con A und PWM, während durch LPS nur aus der Milz isolierte Zellen stimuliert werden konnten.
Für beide Spezies ließ sich eine selektive Wirkung von LPS auf B-Zellen, von Con A auf T-Zellen nachweisen.
Eine ebenfalls selektive Wirkung von PWM auf T-Zellen des Schweines kann belegt, auf T-Zellen des Rindes vermutet werden.
PHA, das sich als wirksames Mitogen für T- sowie B-Zellen des Schweines erwies, scheint hingegen eine selektive Wirkung auf T-Zellen des Rindes auszuüben.

Summary

Porcine and bovine lymphocytes, taken from peripheral blood and spleen, were isolated with the use of Ficoll-Isopaque. The differentiation of the cells resulted from their ability to form E- or EAC-rosettes and the evidence of Ig-receptors.

From the total number of lymphocytes from peripheral blood and spleen, T-cells were identified in 46 % respectively 48 % of porcine and each 29 % of bovine lymphocytes, B-cells in 10 % of the blood lymphocytes and 24 % of the spleen cells in pigs, 20 % of the blood lymphocytes and 24 % of the spleen cells in cattle.

The enrichment of T-cells from both species occured in the effluent of non-adherent cells after filtration of lymphocytes on nylon fiber columns, the enrichment of B-cells was determined after E-rosette sedimentation in the fraction of non-sedimented cells.

After filtration on Helix pomatia lectin columns, there was found an increase in B-cells in the effluent of unbound cells only in bovine lymphocytes. Consequently a specific binding of T-cells to Helix pomatia lectin was proved.

The total number of porcine and bovine lymphocytes both from spleen and blood showed clear reactions to the phytomitogens PHA, Con A and PWM, whereas only spleen cells could be stimulated using LPS.
For both species it was possible to indicate a selective effect of LPS on B-cells and of Con A on T-cells.
A selective effect of PWM on porcine T-cells was evidenced, but only suspected on bovine T-cells.
PHA has been shown to be an effective mitogen for T- and B-cells from pigs. Whereas in cattle PHA seems to have a selective effect only on T-cells.

6. Literaturverzeichnis

Andersson,J., Edelmann,G.M., Möller,G. u. Sjöberg,O. (1972):
Activation of B-lymphocytes by locally concentrated concanavalin A.
Eur.J.Immunol. 2, 233-235

Andersson,J., Melchers,F., Galanos,C. u. Lüderitz,O. (1973):
The mitogenic effect of Lipopolysaccharide on bone marrow-derived mouse lymphocytes.
Lipid A as the mitogenic part of the molecule.
J.exp.Med. 137, 943-953

Anthony,H.M., Kirk,J.A., Madsen,M.K., Mason,M.K. u. Templeman,G.H. (1975):
E and EAC rosetting lymphocytes in patients with carcinoma of bronchus.
I. Some parameters of the test and its prognostic significance.
Clin.exp.Immunol. 20, 29

Bankhurst,A.D., Warner,N.L. u. Sprent,J. (1971):
Surface immunglobulins on thymus and thymus-derived lymphoid cells.
J.exp.Med. 134, 1 005-1 025

Basten,A., Miller,J.F.A.P., Warner,N.L. u. Pye,J. (1971):
Specific inactivation of thymus-derived (T) and non thymus derived (B) lymphocytes by ^{125}J-labelled antigen.
Nature New Biol. 231, 104

Baxley,G., Bishop,G.B., Cooper,A.G. u. Wortis,H.H. (1973):
Rosetting of human red blood cells to thymocytes and thymus-derived cells.
Clin.exp.Immun. 15, 385-392

Bentwich,Z., Douglas,S.D., Siegal,F.P. u. Kunkel,H.G. (1973):
Human lymphocyte-sheep erythrocyte rosette formation; some characteristics of the interaction.
Clin.Immunol.Immunpath. 1, 511

Bianco,C., Patrick,R. u. Nussenzweig,V. (1970):
A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complement complexes.
I. Separation and characterization.
J.exp.Med. 132, 702

Björk,I., Petersson,B.A. u. Sjöquist,J. (1972):
Some physicochemical properties of protein A from Staphylococcus aureus.
Eur.J.Biochem. 29, 579-584

Bona,C., Damais,C., Galanos,C. u. Chedid,L. (1975):
The mitogenic activity of Lipopolysaccharides on lymphocytes in culture.
II. Comparative study in five mammalian species.
In: Urbaschek,B., Urbaschek,R. u. Neter,E., Gram-negative bacterial infections and mode of endotoxin actions.
Springer-Verlag Wien-New York

Boyum,A. (1968):
Separation of leucocytes from blood and bone marrow.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21,suppl.97, 1

Brittinger,G. u. König,E. (1969):
Lymphocytenstimulierung durch Pokeweed-Mitogen (PWM).
Klin.Wschr. 47, 1307

Brown,C.S., Halpern,H. u. Wortis,H.H. (1975):
Enhanced rosetting of sheep erythrocytes by human peripheral blood T cells in the presence of dextran.
Clin.exp.Immunol. 20, 505

Brown,G. u. Greaves,M.F. (1974):
Enumeration of absolute numbers of T an B lymphocytes in human blood.
Scand.J.Immunol. 3, 161

Bundschuh,G. u. Schneeweiß,B. (1976):
Immunologie
Gustav Fischer-Verlag Stuttgart-New York

Cichon, H.U. (1979):
Serologisch nachweisbare B-Lymphocyten spezifische Antigene beim Rind.
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Tiermedizin d. Universität München

Cline,M.J. u. Sweet,V.C. (1968):
The interaction of human leucocytes and lymphocytes.
J.exp.Med. 128, 1309

Dukor,P., Bianco,C. u. Nussenzweig,V. (1971):
Bone marrow origin of complement-receptor lymphocytes.
Eur.J.Immunol. 1, 491-494

Escajadillo,C. u. Binns,R.M. (1975):
Rosette formation with sheep erythrocytes - a possible T-cell marker in the pig.
Int.Archs.Allergy.appl.Immunol. 48, 261

Evans,J., Smith,M.A. u. Steel,C.M. (1975):
Glutaraldehyde and human T-cell rosettes.
J.immunol.Meth. 7, 371

Fink,U. (1977):
Hämatologisches Forschungslabor der I. Med. Klinik re. d. Isar d. Techn. Univ. München.
Persönliche Mitteilung an Cichon, H.U., 1979

Folch,H. u. Waksman,B.H. (1974):
The splenic suppressor cell.
I. Aktivity of thymus-dependent adherent cells: changes with age and stress.
J.Immunol. 113, 127 u. 140-144

Forsgren,A. u. Sjöquist,J. (1966):
"Protein A" from S. aureus.
I. Pseudo-immune reaction with human γ-globulin.
J.Immunol. 97, 822-827

Fruchtmann,R., Uhlenbruck,G., Schmid,D.O. u. Cwik,S. (1977):
Zur Charakterisierung von T- und B-Lymphocyten beim Rind.
Zbl.Vet.Med.B. 24, 486-496

Gitlin,D. (1973):
Maternofetal immunoglobulin transfer mechanism.
Excerpta med. 281, 27

Greaves,M.F. u. Bauminger,S. (1972):
Activation of T and B lymphocytes by insoluble phytomitogens.
Nature New.Biol. 235, 67-70

Greaves,M.F., Bauminger,S. u. Janossy,G. (1972):
Lymphocyte activation.
III. Binding sites for phytomitogens on lymphocyte subpopulations.
Clin.Exp.Immunol. 10, 537-554

Greaves,M.F., Janossy,G. u. Doenhoff,M. (1974):
Selective triggering of human T andB lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens.
J.exp.Med. 140, 1

Grewal,A.S., Rouse,B.T. u. Babiuk,L.A. (1976):
Erythrocyte rosettes - a marker for bovine T cells.
Canad.J.Compar.Med. 40, 298-305

Gürtler,L.G. u. Cleve,H. (1978):
Ulex europeus lectin - a lymphocyte surface label for human B-cells.
Proc. 25th Colloquium Protides of the biological fluids. B. 4, 715-723

Haller,O., Gidlund,M., Hellström,U. et al. (1977):
Mouse natural killer (NK) cells possess receptors for Helix pomatia A hemagglutinin.
Proc. VIII Ann.Meeting Scand.Soc.Immunol.

Hammarström,S. (1973):
Binding of Helix pomatia A hemagglutinin to human erythrocytes and other cells. Influence of multivalent interaction on affinity.
Scand.J.Immunol. 2, 53-66

Hammarström,S., Hellström,U., Perlmann,P. et al (1973):
A new surface marker on T lymphocytes of human peripheral blood.
J.Exp.Med. 138, 1270-1275

Hammarström,S., Dillner,M-L. u. Pérlmann,P. (1975):
The lack of mitogenic response of neuraminidase-treated and untreated human blood lymphocytes to divalent, hexavalent or insoluble Helix pomatia A hemagglutinin.
Exp.Cell.Res. 96, 374-383

Hammerling,U. u. Rajewsky,K. (1971):
Evidence for surface-assotiated immunoglobulin on T and B lymphocytes.
J.Immunol. 1, 447-452

Hellström,U., Perlmann,P., Robertsson,E.S. et al. (1978):
Receptors for Helix pomatia A hemagglutinin (HP) on a subpopulation of human B cells.
Scand.J.Immunol. 7, 143

Hjelm,H., Sjödahl,J. u. Sjöquist,J. (1975):
Immunologically active and structurally similar fragments of protein A from Staphylococcus aureus.
Eur. J.Biochem. 57, 395-403

Huber,Ch., Asamer,H., Huber,H., Wigzell,H. u. Braunsteiner, H., (1971):
Zur funktionellen Differenzierung lymphatischer Zellen: Lymphocyten mit Immunglobulindeterminanten und Bindungsfähigkeit für Immunkomplexe bei der Maus.
Z.ges.exp.Med. 156, 34-51

Hungerford,D.A., Donnelly,A.J., Nowell,P.C. u. Beck,S. (1959):
The chromosome constitution of a human phenotypic intersex.
Amer.J.Human Genet. 11, 215-236

Jondal,M., Holm,G. u. Wigzell,H. (1972):
Surface markers on human T an B lymphocytes.
J.exp.Med. 136, 207-215

Julius,M.H., Simpson,E. u. Herzenberg,L.A. (1973):
A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes.
Eur.J.Immunol. 3, 645-649

Kaplan,M.E. u. Clark,C. (1974):
An improved rosetting assay for detection of human T lymphocytes.
J.immunol.Meth. 5, 131

Kaupp,E., Pabst,R. u. Trepel,F. (1977):
Rosette formation of pig peripheral blood lymphocytes with sheep red blood cells.
Z.Immun.Forsch. 152, 438-446

Lay,W.H. u. Nussenzweig,V. (1968):
Receptors for complement on leucocytes.
J.Exper.Med. 128, 991-1007

Levy u. Rosenberg (1973):
Ohne nähere Angaben zitiert in:
Bundschuh u. Schneeweiß 1976

Lima,E.G.de u. Mitscherlich,E. (1973):
Untersuchungen über die Zahl der B- und T-Lymphocyten im strömenden Blut von gesunden, leukoseverdächtigen und leukosekranken Rindern der Deutschen Schwarzbunten.
Zbl.Vet.Med.B, 20, 665-684

Mackler,B.F., Altmann,L.C., Rosenstreich,D.L. u. Oppenheim, J.J. (1974):
Induction of Lymphokine production by EAC and of blastogenesis by soluble mitogens during human B-cell activation.
Nature, 249, 834-837

Marchalonis,J.J., Cone,R.E. u. Atweel,J.L. (1972):
Isolation and partial characterization of lymphocyte surface immunoglobulins.
J.exp.Med. 135, 956-971

Mehrishi,J.N. (1974):
Cell surface membrane interactions with special reference to lymphocytes in leucemia.
Behring Inst.Mitt. 55, 290-305

Mellstedt,H. (1975):
In vitro activation of human T and B lymphocytes by pokeweed mitogen.
Clin.exp.Immunol. 19, 75

Mercier,P. (1974):
The rosettes and the immuno-cyto-adherence: Analytic essay.
Biomedicine 20, 17-23 u. 131-137

Michlmayr,G. u. Huber,H. (1970):
Receptor sites for complement on certain human peripheral blood lymphocytes.
J.Immunol. 105, 670-676

Miggiano,V.C., Meo,T., Koch,R. et al. (1973):
Ontogeny of cell-mediated immunity in man:
I. In vitro reactivity of various foetal tissues to phytohemagglutinin and to allogenetic leukocytes.
Excerpta med. 281, 15

Möller,G., editor (1970):
Antigen-binding lymphocyte receptors.
Transplant. Rev. 5, 3

Mond,J.J. u. Thorbecke,G.J. (1972):
Proliferative response of normal rabbit and mouse bone marrow cells in vitro.
Cellular.Immun. 5, 480-486

Muralt,G.von (1972):
Die klinische Bedeutung der immunologischen Wechselbeziehungen zwischen Mutter und Kind.
Pädiat.Fortbildk.Praxis 35, 24-60

Nowell,P.C. (1960):
Phytohämagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes.
Cancer Res. 20, 462

Oppenheim,J.J., Rogentine,G.N. u. Terry,W.D. (1969):
The transformation of human lymphocytes by monkey Antisera to human Immunoglobulins.
Immunology 16, 123-138

Oppenheim,J.J. u. Rosenstreich,D.L. (1976):
Mitogens in Immunbiology.
Academic Press London, N.Y.

Parish,C.R. u. Hayward,J.A. (1974):
The lymphocyte surface.
II. Separation of Fc receptor, C'_3 receptor and immunglobulin-bearing lymphocytes.
Proc.roy.Soc. B 187, 65

Peavy,D.L., Shands,J.W., Adler,W.H. u. Smith,R.T. (1973):
Selective effects of bacterial endotoxins on various subpopulations of lymphoreticular cells.
J.infect.Dis. 128 suppl. 91-99

Pernis,B., Forni,L. u. Amante,L. (1970):
Immunglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes.
J.exp.Med. 132, 1001-1018

Phillips,B. u. Roitt,I. (1973):
Evidence for transformation of human B lymphocytes by PHA.
Nature New.Biol. 241, 254-256

Polliak,A., Lampen,N., Clarkson,B.D. u. Harven,E.de (1973):
Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy.
J.exp.Med. 138, 607-624

Preud'Homme,J.L. u. Seligman,M. (1972):
Surface bound immunoglobulins as a cell marker in human Lymphoproliferative Diseases.
Blood 40, 777-794

Raff,M.C., Sternberg,M. u. Taylor,R.B. (1970):
Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells.
Nature 225, 553-554

Raff,M.C. (1971):
The use of surface antigen markers to define different populations of lymphocytes in the mouse.
3rd. Sigrid Juselius Sympos. Helsinki 83-90,
Academic Press, London, New York

Raff,M.C., Nase,S. u. Mitchison,N.A. (1971):
Mouse specific bone marrow derived lymphocyte antigen as a marker for thymus-independent lymphocytes.
Nature 230, 50-51

Reisner,Y., Ravid,A. u. Sharon,N. (1976):
Use of sojabean agglutinin for the separation of mouse B and T lymphocytes.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 72, 1585

Roitt,I. (1977):
Immunologie
Steinkopff Verlag, Darmstadt

Schatiloff,P. (1908):
Die Ehrlichsche Seitenkettentheorie.
Gustav Fischer-Verlag Jena

Schlaak,M. (1975):
Zur Standardisierung und diagnostischen Bedeutung der phytomitogen-induzierten Lymphocytentransformation.
Immunität u. Infektion 3, 136-142

Schlossman,S.F. u. Hudson,L. (1973):
Specific purification of lymphocyte populations in a digestible immunoadsorbent.
J.Immunol. 110, 313-315

Seiler,F.R., Sedlacek,H.H., Kanzy,E.J. u. Lang,W. (1972):
Über die Brauchbarkeit immunologischer Nachweismethoden zur Differenzierung funktionell verschiedener Lymphocyten: Spontanrosetten, Komplementrezeptorrosetten und Immunglobulinrezeptoren.
Behring Institut Mitteilungen 52, 26-72

Sell,St. (1977):
Immunologie, Immunpathologie und Immunität.
Verlag Chemie Weinheim - New York

Shortman,K., Byrd,W., Cerottini,J.C. u. Brunner,K.T. (1973):
Characterization and separation of mouse lymphocytes and subpopulations responding to phytohaemagglutinin and pokeweed mitogen.
Cell.Immunol. 6, 12

Singer,S.J. (1974):
Molekular biology of cellular membranes with application to immunology.
Adv. in Immunol. Vol. 19, 1-68

Stobo,J.D., Rosenthal,A.S. u. Paul,W.E. (1972):
Functional heterogeneity of murine lymphoid cells.
I. Responsiveness to and surface binding of Concanavalin A and Phytohämagglutinin.
J.Immunol. 108, 1-17

Swanborg,R.H., Hellström,U., Perlmann,H. et al. (1977):
A new rat lymphocyte surface marker: characterization and separation of cells with receptors for Helix pomatia hemagglutinin.
Scand.J.Immunol. 6, 235-239

Taylor,R.B., Duffus,P.H., Raff,M.C. et al. (1971):
Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunglobulin molecules induced by anti-immunglobulin antibody
Nature New.Biol. 233, 225

Tizard,I.R. (1977):
Veterinary Immunology
W.B. Saunders Company Philadelphia-London-Toronto

Uhlenbruck,G., Wernet,P. u. Schuhmacher,K. (1973):
Specific T-cell marking by Helix pomatia agglutinin after neuraminidase treatment.
Klin.Wschr. 51, 1210-1211

Uhlenbruck,G. u. Rothe,A. (1974):
Biological alterations of membrane-bound glycoproteins by neuraminidase treatment.
Behring Inst.Mitt. 55, 177-185

Unanue,E.R., Grey,H.M., Rabellino,E., Campbell,P. u. Schmidtke,J. (1971):
Immunoglobulins on the surface of lymphocytes II.
J.exp.Med. 133, 1188-1218

Walker,R.J. u. Fowler,J. (1965):
Granulocyte inhibition of human peripheral blood lymphocyte growth in vitro.
Exp.Cell.Res. 38, 379

Wigzell,H., Sundquist,K.G. u. Yoshida,T.O. (1972):
Separation of cells according to surface antigens by the use of antibody-coated columns. Fractionation of cells carrying immunoglobulins and blood group antigens.
Scand.J.Immunol. 1, 75-87

Wilson,J.A. u. Nossal,G.J.V. (1971):
Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronik lymphocytic leucaemia.
Lancet II., 788-791

Yu,D.T.Y. u. Pearson,C.M. (1975):
The effect of polycations and polyanions on behavior of sheep red blood cell rosettes of human lymphocytes.
J.Immunol. 114, 788

Zeiller,K. u. Pascher,G. (1973):
Detection of T and B cell-specific heteroantigens on electrophoretically separated lymphocytes of the mouse.
Eur.J.Immunol. 3, 614-618

Herrn Professor Dr. H. Buschmann bin ich für die Überlassung des Themas, sowie die wohlwollende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Für wertvolle Hinweise möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. Mayr herzlich danken.

Allen Mitarbeitern des Institutes danke ich für ihre jederzeit freundlich gewährte Unterstützung.

Lebenslauf

1935	Geboren am 19. 11. als dritte Tochter des Elektrikers Stefan Pawlas und seiner Ehefrau Pauline geb. Weiss in Altona
1942	Eintritt in die Volksschule
1947	Übertritt in den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig der Emilie-Wüstenfeld-Schule in Hamburg
1955	Abitur
1955 - 57	Besuch der Max-Reinhardt-Schule des Landes Berlin
1956 - 64	An den städtischen Bühnen Berlin, danach freiberuflich als Schauspielerin tätig
1957 - 66	Verheiratet, zwei Kinder
1971	Aufnahme des Studiums der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1976	Staatsexamen
1977	Approbation als Tierärztin Beginn der vorliegenden Dissertation
1978	Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München